

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Charakterisierung des gesunden und entzündeten Uterus des  
Rindes

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Julian Joachim Bartels

aus Wiesbaden

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Tag der Promotion 08.Februar 2014







## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Aufbau und Funktion des bovinen Uterus.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Anatomie und Histologie des bovinen Uterus.....	3
1.2.	Einfluss des Sexualzyklus auf den Uterus und das Endometrium .....	4
1.3.	Molekularbiologische und histologische Veränderungen am entzündeten Endometrium.....	5
<b>2.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>7</b>
2.1.	Palpation, Vaginoskopie und Metrichcek .....	7
2.2.	Bildgebende Verfahren .....	8
2.3.	Cytrobrush, uterine Lavage und Biopsie.....	8
<b>3.</b>	<b>Einteilung von Endometritiden.....</b>	<b>10</b>
3.1.	Endometritiden bis 21 Tag p.p. ....	10
3.1.1.	Puerperal Metritis.....	10
3.1.2.	Klinische Metritis.....	10
3.2.	Endometritiden ab 21 Tagen p.p. ....	11
3.2.1.	Klinische Endometritis.....	11
3.2.2.	Pyometra.....	11
3.2.3.	Subklinische Endometritis.....	11
<b>4.</b>	<b>Möglichkeiten zur Untersuchung zellulärer und immunologischer Mechanismen des Endometriums .....</b>	<b>12</b>
4.1.	Zell- und Gewebekulturen.....	12
4.1.1.	Zellkulturen .....	12
4.1.2.	Gewebekultur .....	12
4.2.	Bioassay .....	14
4.3.	Histochemische und zytologische Verfahren.....	15
4.4.	Molekularbiologische Verfahren.....	17
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>19</b>
<b>1.</b>	<b>Histologische Untersuchungen.....</b>	<b>19</b>
1.1.	Untersuchungsmaterial und Entnahmezeitraum für die Histologie .....	19
1.2.	Präparation des Gebärmuttergewebes für Histologie, Enzymhistologie und	

	Immunhistologie.....	20
1.3.	Einbettungsverfahren, Schnittherstellung und Färbungen bei Paraffineinbettung .....	21
1.3.1.	Einbettung .....	21
1.3.2.	Immunhistochemie .....	22
1.4.	Einbettungsverfahren, Schnittherstellung und Färbung bei Kunststoffeinbettung .....	24
1.4.1.	Histochemie.....	25
1.4.1.1.	Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung .....	25
1.4.1.2.	Giemsa-Färbung .....	25
1.4.1.3.	Perls-Färbung .....	25
1.4.2.	Enzymhistochemie .....	26
1.4.2.1.	Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase (CAE)-Färbung .....	26
1.4.2.2.	a-Naphtyl-Acetate Esterase (ANA)-Färbung.....	27
1.4.2.3.	Saure-Phosphatase-Färbung .....	27
1.4.2.4.	Peroxidase-Färbung.....	27
1.4.3.	Auswertung der histologischen Schnitte .....	28
1.5.	Zytologische Untersuchung.....	28
1.6.	Bakteriologische Untersuchung .....	28
1.6.1.	Methodik .....	29
1.6.2.	MALDI-TOF .....	29
<b>2.</b>	<b>Untersuchungen an endometrialen Explants.....</b>	<b>30</b>
2.1.	Zeitraum, Ort und Untersuchungsmaterial für Explant-Versuche .....	30
2.2.	Präparation des Gewebes und Erstellung von Explants .....	30
2.3.	Physiologische, histologische und molekularbiologische Untersuchungen an endometrialen Explants .....	31
2.3.1.	PMN-Migrations-Bioassay.....	31
2.3.2.	Vitalitätsbestimmung bei Explantpräparationen .....	32
2.3.3.	Histologische Untersuchung an Explants.....	32
2.3.3.1.	Histochemie.....	32
2.3.3.1.1.	Hämalaun-Eosin Färbung.....	32
2.3.3.1.2.	Giemsa Färbung .....	33
2.3.3.2.	Immunhistochemie .....	33
2.3.4.	Molekularbiologische Untersuchung .....	34

2.3.4.1.	Extraktion und Bestimmung der Integrität der Gesamt-RNA.....	34
2.3.4.2.	Primer .....	36
2.3.4.3.	Reverse Transkription .....	36
2.3.4.4.	Quantitative Real Time PCR.....	37
<b>3.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>38</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Ergebnisse der histologischen Untersuchungen .....</b>	<b>39</b>
1.1.	Methodische Vorarbeiten .....	39
1.2.	Untersuchungen an Uteri nicht tragender Färsen .....	41
1.2.1.	Morphologie .....	41
1.2.2.	Freie Zellen im Endometrium .....	56
1.2.2.1.	Mastzellen .....	56
1.2.2.2.	Neutrophile Granulozyten .....	59
1.2.2.3.	Eosinophile Granulozyten .....	60
1.2.2.4.	Makrophagen.....	62
1.2.2.5.	Lymphozyten.....	64
1.2.2.6.	Plasmazellen.....	69
1.3.	Untersuchungen an klinisch erkrankten Uteri .....	70
1.3.1.	Pathologische Veränderungen .....	70
1.3.2.	Freie Zellen im Endometrium .....	75
1.3.2.1.	Mastzellen .....	75
1.3.2.2.	Neutrophile Granulozyten .....	76
1.3.2.3.	Eosinophile Granulozyten .....	79
1.3.2.4.	Makrophagen.....	79
1.3.2.5.	Lymphozyten.....	80
1.3.2.6.	Plasmazellen.....	83
1.4.	Untersuchungen an Uteri gynäkologisch klinisch gesunder Kühe.....	86
1.4.1.	Morphologie .....	86
1.4.2.	Pathologische Veränderungen .....	88
1.4.3.	Freie Zellen im Endometrium .....	93
1.4.3.1.	Mastzellen .....	93
1.4.3.2.	Neutrophile Granulozyten .....	93
1.4.3.3.	Eosinophile Granulozyten .....	94
1.4.3.4.	Makrophagen.....	94

1.4.3.5.	Lymphozyten.....	94
1.4.3.6.	Plasmazellen.....	98
1.5.	Semiquantitative Auswertung der histologischen Schnitte aller Gruppen.....	100
1.6.	Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen.....	106
1.7.	Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen.....	109
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse der Untersuchungen an endometrialen Explants .....</b>	<b>111</b>
2.1.	Methodische Vorarbeiten zu Versuchen an endometrialen Explants.....	111
2.2.	Stimulationsversuche an endometrialen Explants.....	114
2.2.1.	Vitalität endometrialer Explants nach Stimulation .....	114
2.2.2.	Chemotaxis behandelter Explants im Bioassay .....	116
2.2.3.	Molekularbiologischen Untersuchungen.....	118
2.2.4.	Histologische Befunde an endometrialen Explants nach Behandlung.....	120
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>125</b>
<b>1.</b>	<b>Histologische Untersuchungen .....</b>	<b>125</b>
1.1.	Vergleich gesunder und erkrankter Uteri .....	125
1.2.	Entzündung des Endometriums.....	127
1.3.	Zytologische und bakteriologische Befunde .....	130
<b>2.</b>	<b>Untersuchungen an endometrialen Explants.....</b>	<b>131</b>
2.1.	Vitalität endometrialer Explants.....	131
2.2.	Stimulationsversuch .....	132
<b>3.</b>	<b>Schlussbetrachtung und Ausblick .....</b>	<b>134</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>139</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>143</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>147</b>
<b>IX.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>159</b>
<b>1.</b>	<b>Lösungen für die histologische, immune und enzymhistologische Untersuchungen.....</b>	<b>159</b>
1.1.	Fixiermedium .....	159
1.2.	Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte.....	159
1.3.	Lösungen für die Immunhistochemie.....	160

---

1.4.	Verwendete Antikörper .....	162
1.5.	Lösungen für die Herstellung von Kunststoffschnitten.....	162
1.6.	Lösungen für die Färbung der Kunststoffschnitte.....	163
1.7.	Lösung für die Enzymhistochemie.....	164
1.8.	Protokoll der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte und Einzel Ergebnisdarstellung .....	166
1.9.	Protokolle, Lösungen und Nährböden für die bakteriologische Untersuchung .....	175
1.10.	Lösungen für die Zytologie .....	176
<b>2.</b>	<b>Lösungen und Medien für die Simulations- und Supplementationsversuche .....</b>	<b>177</b>
2.1.	Lösungen für Versuche mit Explants .....	177
2.2.	Lösungen für die Molekularbiologische Arbeit .....	178
<b>3.</b>	<b>Herstellernachweis der verwendeten Geräte und .....</b>	<b>179</b>
3.1.	Geräte .....	179
3.2.	Verbrauchsmaterialien .....	181
<b>X.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>185</b>



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

A.dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
AMP	Antimikrobielle Proteine
ANA	a-Naphtyl-Acetat Esterase
APP	Akute-Phase-Proteine
CAE	Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase
CD	Cluster of Differentiation (Molekulare Unterscheidungsmuster von Zellen)
cDNA	complementary DANN
C <sub>t</sub>	cycle threshold
CXCL	$\alpha$ -Chemokin-Ligand
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Deoxynucleotide Triphosphates
dsDNA	Doppelsträngige DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GMA	Methacrylsäure-2-hydroxyethylester
Grp.	Gruppe
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I $\kappa$ B	kappaB Inhibitor
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
Min/Max	Minimalwert/Maximalwert
MMA	Methacrylsäuremethylester
mRNA	messenger RNA

n	Anzahl der Einzelbeobachtungen
NF- $\kappa$ B	nuklearer Transkriptionsfaktor kappaB
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.p.	post partum
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E2
PGF $\alpha$	ProstaglandinF2 $\alpha$
pH	Wasserstoffionen-Exponent
PMN	Polymorphkernige Granulozyten
PRRs	Pathogen-recognizing-receptors
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
RQI	RNA-Quality Index
RT	Reverse Transkriptase
spp.	species pluralis (lateinisch: verschiedener Spezies)
Staph.	Staphylococcus
Str.	Stratum
Strep.	Streptococcus
TBS	Tris Buffer Saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
tRNA	transfer RNA
vs.	Versus
vgl.	Vergleiche
WST	water-soluble tetrazolium salt



## I. EINLEITUNG

Die Reproduktion ist entscheidend für den Erfolg der Milch- und Fleischrinderproduktion (BISINOTTO & SANTOS, 2011). Der erhöhte Selektionsdruck in der Milchproduktion als auch in der Fleischproduktion während der letzten 50 Jahre steht hierbei im Zusammenhang mit einer globalen Abnahme der Fertilität bei Milch- und Fleischrindern (DISKIN et al., 2011; EVANS & WALSH, 2011). Die meisten Gesundheitsprobleme von Hochleistungsrindern entstehen im Zusammenhang mit der Geburt (ZERBE et al., 2000) wobei die post partal entstehende Endometritis hohe wirtschaftliche Schäden verursacht (KÖNIG, 2003).

Kühe mit Dystokie, Retentio secundinarum, Zwillings- oder Totgeburten und metabolischen Beschwerden entwickeln schneller Entzündungen an der Gebärmutter (LEWIS, 1997). Die physiologische Involution als der Prozess, der den Uterus nach der Geburt für eine weitere Trächtigkeit vorbereitet, soll innerhalb von 6 bis 8 Wochen abgeschlossen sein (MELENDEZ et al., 2004). Es scheint, als gehe sie immer mit einer bakteriellen Kontamination einher, die eine Antwort des lokalen Immunsystems hervorruft, die Infektion zu beseitigen (CHAPWANYA et al., 2009). Dabei bilden u.a. neutrophile Granulozyten (PMN) die erste Abwehr gegen pathogene Organismen. Dies zeigt sich in einem erhöhten PMN-Gehalt im Uteruslumen (BUTT et al., 1991). Vor allem die subklinische Endometritis wird durch einen erhöhten PMN-Gehalt mit unzureichenden Reproduktionsleistungen in Verbindung gebracht (BARLUND et al., 2008). Die genauen Gründe für eine beeinträchtigte Immunfunktion bei peripartalen Kühen sind unklar. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang der peripartale Energieabfall, Vitamin- und Mineralmangelversorgung, eine negative Energiebilanz mit Mobilisation von Fett und Protein sowie die dramatischen peripartalen Veränderungen auf hormoneller Ebene (GALVAO et al., 2011).

In vielen klinischen Arbeiten ist das lokale Immunsystem der Mittelpunkt. PMN dienen hier häufig als Grundlage für die Charakterisierung von Endometritiden, wodurch sie auch in der wissenschaftlichen Forschung in den Mittelpunkt gerückt sind. In zahlreichen Arbeiten wurde in vivo als auch in vitro das Entzündungsgeschehen am Uterus und der Einfluss der PMN untersucht. Dabei ist relativ wenig über die Faktoren uteriner Gesundheit, noch wie die

Widerstandskraft gegen uterine Erkrankungen gestärkt werden kann bekannt (LEBLANC et al., 2011).

Um Aufschluss über die an einer Entzündung beteiligten Zellen zu geben, wurden im ersten Teil dieser Arbeit gesunde und erkrankte Uteri in einer umfänglichen histologischen Betrachtung gegenüber gestellt. Die gewonnenen Erkenntnisse dienen zur Differenzierung einer weiteren Gruppe, in der Kühe mit Verdacht auf subklinische Endometritis untersucht werden.

Im zweiten Teil wurde anhand von Explants aus endometrialen Gewebestücken ein ex vivo Modell zu endometrialen Entzündungsreaktionen etabliert. Bei weitgehend intakter geweblicher Zusammensetzung ließen sich Schlüsselfaktoren entzündlicher Prozesse als Reaktion des Endometriums auf pathologische Stimuli auf physiologischer, molekularbiologischer und histologischer Ebene erfassen.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Aufbau und Funktion des bovinen Uterus

#### 1.1. Anatomie und Histologie des bovinen Uterus

Die weiblichen Geschlechtsorgane lassen sich in keimbereitende (Ovarien), keimleitende (Eileiter) und keimbewahrende (Gebärmutter) Organe einteilen (SCHULER et al., 1999). Ovarien und Eileiter liegen cranial an der als *Uterus bicornis* ausgebildeten Gebärmutter (*Uterus*). Diese wiederum gliedert sich von cranial ausgehend in zwei Hörner (*Cornua uteri*), den Körper (*Corpus uteri*) und den Gebärmutterhals (*Cervix uteri*). Caudal der Cervix schließt sich die Vagina an (DRENNAN & MACPHERSON, 1966).

Die beiden Uterushörner sind widderhornartig gewunden (KÖNIG, 2011). Bei multiparen Tieren reichen sie über das *pecten ossis pubis* bis in die Bauchhöhle. Nach der Einmündung der Eileiter, erweitern sich die Hörner ampullenförmig und vereinigen sich nach 25 bis 35 cm zum *Corpus uteri*. Dieser ist 3 cm lang und setzt sich caudal in die *Cervix uteri* fort, die altersabhängig zwischen 6 und 8 cm lang ist (EDWARDS, 1965).

Die morphogenetischen Veränderungen während der Entwicklung der Gebärmutter sind bei allen Säugetieren gleich: 1. Organisation und Stratifikation des endometrialen Stromas, 2. Differenzierung und Wachstum des Myometriums und 3. die koordinierte Entwicklung der endometrialen Drüsen (GRAY et al., 2001).

Das ausgereifte Endometrium (*Tunica mucosa*) wird aus luminalen und glandulären Epithelialzellen (*Epithelium culmunare*), Stromazellen, Leukozyten (*Lamina propria mucosa*) und angrenzenden glatten Muskelzellen mit abschließenden Endothelialzellen gebildet (*Tunica muscularis*) (DONOFRIO et al., 2008). Beim Wiederkäuer ist das Oberflächenepithel hochprismatisch und kann stellenweise mehrreihig sein (*Epithelium pseudostratificatum columunare*). Als weitere Besonderheit sind beim Rind knopfförmige Vorwölbungen der *Lamina propria* entwickelt. Dieses spinozelluläre Bindegewebe bildet die Grundlage der Karunkeln (LIEBICH, 2003). Es besteht aus einer reich vaskularisierten Basalmembran (Fibroblasten), die von einem kubischen Epithel überlagert wird (MCNAUGHTON & MURRAY, 2009). Drüsen fehlen in den

Karunkeln (LIEBICH, 2003).

Das Endometrium bildet den ersten Schutzwall gegen Infektionen, der sich aus Komponenten des unspezifischen und spezifischen Immunsystems zusammensetzt. Die erste Abwehr ist durch unspezifische Immunmechanismen gegeben, das Toll-like-Rezeptoren (TLR), antimikrobielle Proteine (AMP) und Akute-Phase-Proteine (APP) (DAVIES et al., 2008) sowie polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) und gewebspezifische Makrophagen (KÖNIG, 2003) beinhaltet. COBB and WATSON (1995) zeigten eine zyklusunabhängige Verteilung der Makrophagen im Endometrium, wobei im glandulären Gewebe keine Makrophagen nachgewiesen werden konnten.

Neutrophile Granulozyten wandern im Gewebe von der peripheren Zirkulation bis in das Uteruslumen (KIM et al., 2005). Das subepitheliale Stroma enthält T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Antigen-präsentierende Makrophagen, die auch im Myometrium zu finden sind (SINGH et al., 2008).

## **1.2. Einfluss des Sexualzyklus auf den Uterus und das Endometrium**

Während des Sexualzyklus und auch der Trächtigkeit zeigt das bovine Endometrium charakteristische morphologische und auch funktionelle Veränderungen, die hauptsächlich durch Progesteron, Östrogen und Oxytocin reguliert sind (SPENCER et al., 2004). Die Zykluslänge beträgt beim Rind 18-24 Tage und kann in eine luteale Phase (14-18 Tage) sowie eine folliculäre Phase (4-6 Tage) unterschieden werden (FORDE et al., 2010).

Während der folliculären Phase erhöht sich die Mitoserate im Epithelium und Stroma. Außerdem steigt der Grad der Zilierung sowie der Verzweigung der endometrialen Drüsen. Diese Verzweigung erreicht einen Höhepunkt, wenn die Zellproliferation während der frühen lutealen Phase beendet ist. Zur gleichen Zeit wird das Basalzcytoplasma des glandulären Epithels durch angesammeltes Drüsenmaterial vakuolisiert. In der späten lutealen Phase erscheint dieses Material im apikalen Zytoplasma und füllt das Drüsenlumen (WANG et al., 2007).

Unter dem Einfluss von Progesteron sind die Drüsen stärker gewunden, verzweigt und zeigen eine höhere sekretorische Leistung. Die Epithelzellen haben eine mittlere Höhe und die Ödematisierung des Stroma ist gering (SHAHAM-ALBALANCY et al., 1997).

Estradiol hingegen stimuliert das Endometrium zur Proliferation und ist erforderlich für die Epithelialmorphogenese und Zelldifferenzierung (COOKE et

al., 1997). Des Weiteren beeinflusst es Länge und Anzahl der tubulären Drüsen, sowie die Höhe der glandulären Epithelzellen (SHAHAM-ALBALANCY et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass der uterine Blutfluss durch Östrogene erhöht wird, während er in der Gelbkörperphase absinkt (HONNENS et al., 2011).

Beide Sexualsteroiden haben auch einen großen Einfluss auf den Verlauf von Infektionen und Entzündungen. So unterdrückt Progesteron die Proliferation von Lymphozyten, was wiederum die Anfälligkeit für bakterielle Infektionen erhöht (HERATH et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass der Uterus während des Östrus und somit unter Östrogeneinfluss weniger anfällig für bakterielle Infektionen ist (SHELDON et al., 2003).

Auch die Expression von Cytokinen wird durch den Zyklus beeinflusst. Aus der CXC-Chemokin Familie sind CXCL5, Interleukin 1B und Interleukin 8 nahe dem Zeitpunkt der Ovulation hochreguliert (FISCHER et al., 2010).

Entzündungsmediatoren können ebenfalls einen Effekt auf das Zyklusgeschehen und somit auf das Endometrium haben. Geringe  $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen unterstützen die Gelbkörperregression, erhöhte Konzentrationen hingegen fördern die Progesteron- und  $\text{PGE}_2$ -Sekretion und verlängern somit den Zyklus. Den gleichen Effekt zeigen Infektionen, die sowohl die Ovulation als auch die Konzeption und den Trächtigkeitserfolg über diese Mechanismen beeinflussen (GREEN et al., 2011).

### **1.3. Molekularbiologische und histologische Veränderungen am entzündeten Endometrium**

Nach dem Kalben ist der Uterus bei mehr als 90% der Kühe mit Bakterien kontaminiert, von denen einige pathogen sind (AZAWI, 2008), was wiederum zur Sekretion von Chemokinen und Cytokinen führt (GALVAO et al., 2011).

Uterine Bakterien sind charakterisiert durch Pathogen-assoziierte-molekulare Muster (PAMPs). Pathogen-recognizing-receptors (PRR) auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems, aber auch an endometrialen Epithelzellen sind für die Erkennung der PAMP's verantwortlich. Die vorherrschende Familie bei dieser Rezeptor-Gruppe sind die Toll-like Rezeptoren (TLR1 bis TLR10) (TAKEUCHI & AKIRA, 2010). DUDLEY et al. (1993) konnten zeigen, dass vor allem der Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) eine Schlüsselrolle bei der Entzündungskaskade im bovinen Uterus spielt. An ihm binden Endotoxine wie

das von *E.coli* stammende Lipopolysaccharid (LPS). Findet eine Anlagerung an diesem Rezeptor statt, werden Immunmediatoren wie TNF $\alpha$  und Stickstoffmonoxid freigesetzt. Außerdem sorgt eine Stimulation der TLR für die direkte Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors kappaB (NF- $\kappa$ B), der ebenfalls eine Signalkaskade anstößt (WERLING et al., 2006). Dieser Transkriptionsfaktor ist im Zytoplasma durch die Bindung an das inhibierende Protein von NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) normalerweise inaktiv. Der pathogene Reiz führt zu einer unmittelbaren proteolytischen Spaltung des I $\kappa$ B-Komplexes, wodurch NF- $\kappa$ B freigesetzt wird.

Bei Säugern gibt es fünf verschiedene NF- $\kappa$ B-Familienmitglieder: RelA/p65, RelB, c-Rel, p50 (NF- $\kappa$ B1), und p52 (NF- $\kappa$ B2). NF- $\kappa$ B-Proteine binden an die  $\kappa$ B-Bindungsstellen entweder als Homodimer oder Heterodimer und bewirken so einen positiven oder negativen Effekt auf die Transkription des Zielgens (LISZCZAK et al., 1977). Es gibt eine ganze Fülle an proinflammatorischen Genen, die durch NF- $\kappa$ B-Bindungsstellen geregelt werden (YANG et al., 2008). Dazu gehören auch die Cytokine IL-1B, IL-6 und IL-8 (DUDLEY et al., 1993).

Die durch das Chemokin Interleukin 8 bewirkte Migration der PMN vom Blutgefäß in das extravaskuläre Gewebe hin zum Ort der Entzündung ist ein wichtiger Bestandteil der unspezifischen Immunantwort (ZERBE et al., 2003). Kühe, die eine Endometritis entwickeln, zeigen um den Zeitpunkt der Geburt einen niedrigen Einstrom von PMN (GALVAO et al., 2010). NF- $\kappa$ B bewirkt indirekt durch die Hemmung der PMN-Apoptose eine Erhöhung der PMN-Konzentration bei lokaler Entzündung (NOLAN et al., 2000).

Je nach Schweregrad ist die Endometritis histologisch charakterisiert durch die Zersetzung des Oberflächenepithels, Infiltration von Entzündungszellen, ein Ödem des Epithelgewebes sowie unterschiedliche Anhäufungen von Lymphozyten und Plasmazellen im Oberflächengewebe (BONDURANT, 1999).

## **2. Diagnostik**

### **2.1. Palpation, Vaginoskopie und Metrichheck**

Für die Diagnose der Endometritis wendet man meist die transrektale Palpation und die Vaginoskopie an.

Die transrektale Palpation ermöglicht eine Beurteilung der Horngröße und der Gesamtgröße der Gebärmutter, der Kontraktilität des Organs und den Nachweis von Flüssigkeit in einem oder beiden Uterushörnern. Die Beurteilung erfolgt unter Berücksichtigung des Involutionsstadiums (RUNCIMAN et al., 2008). Obwohl diese Befunde in der klinischen Praxis häufig erhoben werden, ist ihre Aussagekraft über die zu erwartende Fruchtbarkeitsleistung relativ gering. Hinweise auf eine reduzierte Fruchtbarkeitsleistung gibt z.B. der cervikale Durchmesser. Ein Durchmesser von mehr als 7,5 cm 20 Tage post partum weist auf eine Endometritis hin (PLETICHA et al., 2009). Aber auch mit dieser Methode gelingt eine sehr subjektive Diagnose zum Entzündungsgrad des Endometriums oder des Gesamtorganismus, die nur ungenau und schwer reproduzierbar ist (WESTERMANN et al., 2010).

Die Vaginoskopie wird zur Darstellung und Beurteilung des äußeren Muttermundes angewandt. Hierbei kann Form, Farbe und Öffnungsgrad beurteilt werden. Ist Vaginalausfluss vorhanden, kann die Menge und Qualität bestimmt werden (BARTOL et al., 1985). Die Beurteilung der Ausflussqualität kann erste Schlüsse auf eine mögliche bakterielle Infektion und uterine Entzündung geben. Eine Beteiligung von Bakterien ist häufiger, umso mehr Eiter im Ausfluss vorhanden ist (DOHMEN et al., 2000). Die Vaginoskopie ist damit eine relativ gute Methode für die Endometritisdiagnostik, vor allem in Verbindung mit der transrektalen Palpation. Sie wird aktuell von den praktizierenden Tierärzten jedoch relativ selten angewandt (BARLUND et al., 2008).

Eine ebenfalls einfach durchzuführende Methode ist der Einsatz des Diagnosegeräts Metrichheck. Dieses besteht aus einem ca. 50 cm langen Edelstahlstab, der an einem Ende einen Griff und am anderen Ende einen Gummikelch hat. Nach dem Einführen in die Vagina sammelt sich beim Zurückziehen cervicale Flüssigkeit mit eventuellen Beimengungen in dem Gummikelch, die dann extravaginal beurteilt werden kann. Dadurch wird ohne zeitaufwendige Prozeduren eine schnelle Diagnosestellung ermöglicht (MCDOUGALL et al., 2011).

Im Vergleich der unterschiedlichen Methoden wurden mittels Metrichcheck abweichende Ergebnisse erzielt. Somit können mit dieser Methode nur Verdachtsdiagnosen gestellt werden (DUBUC et al., 2010). PLETICHA et al. (2009) konnten jedoch durch diese Methode häufiger Anzeichen für eine Endometritis feststellen, als dies mittels rektaler Palpation oder Vaginoskopie möglich war.

## **2.2. Bildgebende Verfahren**

Die bildgebenden Verfahren, insbesondere die Sonographie, finden auch in der Nutztiergynäkologie immer mehr Anwendung. Durch die Möglichkeit, Standbilder zu erzeugen und auszumessen, hat die Ultraschalltechnik an Bedeutung in der Diagnostik gewonnen. Durch das Auswerten mehrerer Messparameter kann der Gesamtstatus der Gebärmutter relativ gut dargestellt werden. Herangezogen werden dazu die Größe der Uterushörner an der Basis, der ovarielle Status sowie Vorkommen und Echogenität von uteriner Flüssigkeit (SENOSY et al., 2011).

Seitdem die B-Mode-Sonographie eingeführt wurde, ist es möglich, morphologische uterine Veränderungen durch nicht invasive Techniken darzustellen (SCHMAUDER et al., 2008). Im Zusammenhang mit der transrektalen Palpation kann die Ultraschalluntersuchung helfen, Füllung und Wanddicke des Uterus zu klassifizieren (KASIMANICKAM et al., 2004).

## **2.3. Cytrobrush, uterine Lavage und Biopsie**

Um ein möglichst genaues Bild zur zytologischen Situation des Uterus zu bekommen, stehen mit Cytobrush, uterine Lavage und uterine Biopsie drei Techniken zur Verfügung. Hierbei werden unter transrekter Kontrolle, nach Passage von Vagina und Cervix, Zellproben aus dem Uterus gewonnen. Diese Methoden werden wissenschaftlich vor allem für die Diagnostik der subklinischen Endometritis eingesetzt, haben aber noch keine breite Praxisanwendung gefunden.

Bei der Cytobrushmethode wird ein Bürstchen, geschützt durch einen beweglichen Katheter, in den Uterus eingebracht. Nach dem Freisetzen des Bürstchens wird dieses an der Uteruswand abgerollt. Im Katheter wird das Bürstchen zurückgeführt und anschließend auf einem Objektträger ausgestrichen und gefärbt (PLONTZKE et al., 2010).

Bei Methode zwei, der uterinen Lavage, wird ein Plastikkatheter in den Uterus



eingebraucht. Anschließend wird über diesen Katheter eine Spülflüssigkeit infundiert. Die Flüssigkeit wird nach moderater Massage des Uterus durch denselben Katheter resuspendiert (GILBERT et al., 2005). Die gewonnene Flüssigkeit wird mit einer Cytozentrifuge auf einen Objektträger zentrifugiert. Für die Auswertung werden die Zellen gefärbt (CHEONG et al., 2011).

Diese beiden zytologischen Methoden spiegeln vor allem den Anteil vorhandener PMN wieder. Dabei steht noch kein Richt- oder Schwellenwert für die Diagnose der subklinischen Endometritis fest. Die Werte schwanken zwischen 5% und 18% neutrophiler Granulozyten in der zytologischen Probe (SHELDON et al., 2009). Für die histologische Untersuchung von Biopsien wird eine Biopsiezange in den Uterus eingeführt. Unter transrektaler Kontrolle wird mit der Zange ein Gewebestück aus der Uteruswand ausgestanzt (BONNETT et al., 1991a). Anschließend wird das Gewebestück je nach Untersuchungsmethode in bestimmte Medien überführt. Die Auswertung findet an histologischen Schnitten statt. Dabei werden Kriterien wie entzündliche Infiltration, morphologische Veränderung des Gewebes und Vaskularisation berücksichtigt (BONNETT et al., 1991c; CHAPWANYA et al., 2010).

### **3. Einteilung von Endometritiden**

In der wissenschaftlichen Literatur findet man eine Vielzahl von Publikationen mit Bezug zu uterinen Infektionen und Inflammation bei Mensch und Tier.

Im tiermedizinischen Bereich konzentrierten sich die Untersuchungen auf die Stute und die Kuh (LEWIS, 1997; NASH et al., 2008). Obwohl akute puerperal Infektionen und Entzündungen sowie chronische Geschehen von großer medizinischer Bedeutung sind, gibt es noch Defizite in der Diagnostik und Kategorisierung der relevanten Entzündungsformen des bovinen Uterus. In der Literatur werden häufig die Begriffe akute, chronisch und klinisch relevante Endometritis genannt. Sie werden benutzt, um Parameter, wie die unterschiedliche Dauer der Erkrankung, unterschiedliche Qualitäten des cervicovaginalen oder vaginalen Ausflusses in die Begriffsbestimmung einfließen zu lassen. Diese Begriffe geben nur eine ungenügende Aussage über den genauen Entzündungsvorgang. Allgemein anerkannt ist inzwischen die Kategorisierung nach SHELDON et al. (2006). Diese deckt den Bedarf für praktizierende Tierärzte weitgehend ab und bildet deshalb die Basis für die klinische Kategorisierung in der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden werden deshalb die Definitionen der relevanten Entzündungsformen kurz dargestellt.

#### **3.1. Endometritiden bis 21 Tag p.p.**

##### **3.1.1. Puerperal Metritis**

Die puerperal Metritis ist eine akute systemische Erkrankung, die gewöhnlich innerhalb 10 Tage nach der Geburt auftritt. Sie wird hervorgerufen durch eine peripartale bakterielle Kontamination. Charakterisiert wird sie durch rotbraunen wässrigen uterinen Ausfluss und Fieber. In manchen Fällen wird sie von reduzierter Milchleistung, Mattheit, Inappetenz oder Anorexie, erhöhter Herzfrequenz und Dehydratation begleitet. Die Bezeichnung puerperal Metritis ist auf Tiere mit den obengenannten Symptomen, einem anormal vergrößerten Uterus und Fieber innerhalb von 21 Tagen p.p. anzuwenden (SHELDON et al., 2006).

##### **3.1.2. Klinische Metritis**

Der Begriff der klinischen Metritis soll für Tiere verwendet werden, die bei anormal vergrößertem Uterus purulenten Ausfluss an der Vagina innerhalb von 21 Tagen p.p aufweisen.

### **3.2. Endometritiden ab 21 Tagen p.p.**

#### **3.2.1. Klinische Endometritis**

Die klinische Endometritis ist gekennzeichnet durch purulentes (>50% Eiter) oder mucopurulentes (etwa 50% Eiter und 50% Schleim) uterines Exsudat in der Vagina  $\geq 21$  Tage post partum. Des Weiteren treten keine Anzeichen einer systemischen Erkrankung auf. Zu den schon genannten signifikanten Faktoren kommt als hinweisendes Symptom ein Durchmesser der Cervix von mehr als 7,5 cm. Eine klinische Endometritis besteht immer bei Kühen mit einem purulentem Ausfluss 21 Tage p.p. oder mucopurulentem Ausfluss 26 Tage p.p. (SHELDON et al., 2006).

#### **3.2.2. Pyometra**

Die Pyometra ist durch eine Ansammlung von purulentem oder mucopurulentem Material im Uterus und einer Vergrößerung des Organs charakterisiert. Zudem muss per Definition ein persistierender Gelbkörper über mehr als 21 Tage existieren. Die *Cervix uteri* ist auf Grund der Progesterondominanz unterschiedlich effizient verschlossen. Kann Eiter durch die *Cervix* in die *Vagina* fließen, spricht man von einer offenen Pyometra, bei festem Verschluss der Cervix hingegen von einer geschlossenen Pyometra (GRUNERT, 1999).

Die Pyometra stellt sich sonographisch als eine uterine Ansammlung von Flüssigkeit mit unterschiedlicher Echogenität bei vorhandenem Corpus luteum dar (SHELDON et al., 2006).

#### **3.2.3. Subklinische Endometritis**

Die subklinische Endometritis wird als endometriale Entzündung des Uterus >21 Tage p.p. ohne klinische Symptomatik definiert. So ist in der Vagina kein Eiter zu finden. Die Entzündung kann durch zytologische Methoden diagnostiziert werden. Bei betroffenen Tieren wurde bisher die subklinische Erkrankung anhand des erhöhten Anteils von neutrophilen Granulozyten in Spülproben oder Abstrichen diagnostiziert. Die Angaben reichen von 5% bis 18% PMN (SHELDON et al., 2006).

Die subklinische Endometritis ist durch die Reduktion der Fruchtbarkeit und erhöhte Abgangsraten ohne Anzeichen einer klinischen Endometritis gekennzeichnet (SHELDON et al., 2009).

## **4. Möglichkeiten zur Untersuchung zellulärer und immunologischer Mechanismen des Endometriums**

### **4.1. Zell- und Gewebekulturen**

Die Zell- und Gewebekultivierung ist schon lange bekannt. Sie bietet einzigartige Möglichkeiten für die Untersuchung von Organen unter definierten Bedingungen (FIGGE, 1960).

#### **4.1.1. Zellkulturen**

Die Kultivierung von Zellen aus dem Endometrium wird beim Menschen seit 1927 erfolgreich durchgeführt. Diese Methode wurde später bei zahlreichen anderen Spezies etabliert (FORTIER et al., 1988). Es ist inzwischen möglich, Monokulturen von allen Zelltypen aus dem Endometrium anzulegen (LISZCZAK et al., 1977). Dies ermöglicht eine gezielte Untersuchung verschiedener Zellmechanismen an den einzelnen Zelltypen. Einerseits kann das immunologische Verhalten der Zellen betrachtet werden, andererseits kann die Reaktion auf unterschiedliche pathologische und/oder physiologische Situationen im Einzelnen untersucht werden (FORTIER et al., 1988). Mit der Zellkultur ist man heute in der Lage, relativ einfache Infektionsmodelle zu erstellen. Unzureichende Berücksichtigung von Zell-Zell-Interaktionen verschiedener Zelltypen limitiert die Interpretation der Ergebnisse und die Aussagekraft bleibt eingeschränkt. Dies entspricht nicht den natürlichen Verhältnissen im Organ (SHELDON et al., 2010).

#### **4.1.2. Gewebekultur**

Die Kultivierung von Gewebe in Form von Explants hat in die Wissenschaft Einzug gefunden, um die Interaktion und Effekte von Mischkulturen zu untersuchen (DUDLEY et al., 1993). Die Kultivierungsmethoden haben sich in den vergangenen Jahren weiter entwickelt. Die frühen Modelle waren die sogenannten Batch Systeme. Sie sind statisch, das heißt, das Gewebestück wird nach der Gewinnung in Kulturmedium unter einer definierten Atmosphäre inkubiert (NASH et al., 2010; RANDALL et al., 2011). Um die Effekte, die auf eine Schleimhaut als Grenzgewebe einwirken, zu berücksichtigen, hat man verschiedene Systeme entwickelt. Die Gemeinsamkeit dieser Systeme ist die Kultivierung des Gewebes an der Grenze zu einer gesättigten Atmosphäre

(LEUNG & WATHES, 2000; NEWBY et al., 2005). Die aufwendigsten Systeme sind dynamische. Hierbei werden die Kulturbedälter bewegt, so dass das Medium ständig an dem Explant vorbei fließt. Der Vorteil ist die Verdünnung und der Abtransport von Zellprodukten direkt am Explant (RANDALL et al., 2011). Sie wurden bis jetzt am Endometrium nicht angewandt.

Endometriale Explants finden beim Rind eine immer breitere Anwendung. Anfangs wurde an ihnen das lokale Stoffwechselgeschehen untersucht (LEWIS et al., 1982; BARTOL et al., 1985). Außerdem dienen sie zur Untersuchung der Mechanismen der weiblichen Geschlechtshormone (LEUNG et al., 2001; MANN, 2001) sowie des Entzündungsgeschehens (MILLER et al., 2007).

Im Entzündungsmodell werden hier attenuierte Keime oder Bestandteile eines Keimes eingesetzt. Besondere Bedeutung hat hier Lipopolysaccharid (LPS) erlangt. LPS ist ein makromolekularer Zellmembranbestandteil von *E. coli*. Als einzelne Substanz ruft es die gleiche Reaktion wie das gesamte Bakterium hervor (DOHMEN et al., 2000). Gebunden an Toll-like Rezeptoren stößt es die NF- $\kappa$ B Kaskade an, so dass die Zellen Cytokine in das Medium abgeben. Nach erfolgter Übermittlung kann das Kulturmedium als Untersuchungsgrundlage genutzt werden. Die Informationen aus dem Explant können aus dem Überstand mit den verschiedenen Nachweismethoden, z.B. Enzym Linked Immunosorbent Assay, Western Blot oder Bioassay ausgewertet werden (LEUNG et al., 2001; LIND, 2011; BORGES et al., 2012).

Das Explant an sich kann ebenfalls als Untersuchungsgrundlage dienen. Der Einfluss wird wiederum durch die Coinkubation mit dem im Medium gelösten Stoff ausgeübt. Das Explant wird dem Medium entnommen und in ein Fixationsmedium überführt. Die Fixation ist abhängig von der anschließenden Untersuchungsmethode. Dies kann auf morphologischer Ebene (siehe Kap. II. 4.3; S.15) sowie auf zellulärer oder molekularbiologischer Ebene erfolgen (siehe Kap. II. 4.4; S.17).

Die Untersuchung an Explants bezieht sich immer auf die ersten Stunden nach der Gewebeentnahme. Hierbei wird die Unversehrtheit des Gewebes unterstellt. Wenige Untersuchungen haben sich mit der Vitalität und Integrität von Gewebe-Explants beschäftigt. Eine Überprüfung kann mittels histologischer Methoden erfolgen. Dazu eignen sich etablierte Methoden wie die Histologie, Immunhistologie oder Insituhybridisierung (BORGES et al., 2012).

Ein relativ neuer Ansatz ist die Verwendung von wasserlöslichem Tetrazoliumsalz (WST) für die Einschätzung der Vitalität von Explants. Hierbei wird WST durch eine endogene Dehydrogenase der Atmungskette in zwei Schritten zu Formazan reduziert (ENGELHARDT et al., 1958). Ursprünglich als Proliferationstest in Monolayer-Zellkulturen verwendet, kann das verwendete wasserlösliche Tetrazoliumsalz auch in statischen Kulturen, wie der Explantkultur eingesetzt werden (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

#### **4.2. Bioassay**

Grundsätzlich dienen Bioassays der Untersuchung der Wirkung bestimmter Stoffe auf lebende Organismen (RIJK et al., 2008). Die in der Arbeit angewandte Variante untersucht die Chemotaxis von Explantüberständen auf PMN (Chemotaxisassay). Als Standard dient hierbei die Wirkung von Interleukin 8 (IL-8), einem der bedeutendsten Chemokine für die Rekrutierung von Granulozyten, wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten. So ist bei der Endometritis die Expression von IL-8 mRNA im Endometrium erhöht (DONOFRIO et al., 2010). Es ist ein Mitglied der CXC Chemokinfamilie, die sich durch gleiche Membranproteinstrukturen auszeichnet (MUNOZ et al., 2011). Die Interaktionen durch IL-8 beginnen bereits als Margination in den Blutgefäßen. Durch die Anlagerung an den Endothelien können z.B. Granulozyten in weiteren Schritten zwischen zwei Endothelzellen hindurch wandern (PAAPE et al., 2003). Diese Migration wird im Chemotaxisassay nachgestellt. Hierbei sind zwei Flüssigkeiten durch eine horizontal angeordnete permeable Membran getrennt. Unter der Membran befindet sich die Testflüssigkeit, z.B. Überstand aus der Explantkultur mit chemotakisch wirksamem Bestandteil, überschichtet von Testpuffer. Über die Membran wird der Testorganismus, in diesem Fall migrationsfähige PMN, appliziert. Die PMN folgen nun entlang des sich bildenden Konzentrationsgradienten dem Lockstoff durch die 3 µm großen Poren der Membran. Dieser Versuchsaufbau wird ebenfalls mit einer definierten Menge IL-8 als Testreagenz durchgeführt. Um die relative Migrationsrate zu bestimmen, wird die Migrationsrate aus dem Versuch der Testsubstanz ins Verhältnis zur IL-8 Kontrolle gesetzt (LIND, 2011).

### 4.3. Histochemische und zytologische Verfahren

Die histologische Untersuchung post mortem ist eine zuverlässige Methode, die nach Spezialfärbungen spezifische Diagnosen zulässt (LEIPIG, 2010).

Für die genaue Charakterisierung von Zelltypen steht neben der Immunohistochemie die Enzymhistochemie zur Verfügung. Letztere beruht auf der Sichtbarmachung zellspezifischer Enzyme durch die irreversible Bindung von Substrat (HERMANN, 1987).

Der Nachweis von Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase (CAE) und A-Naphtyl-Acetate Esterase (ANA) erfolgt durch die simultane Azokopplung. Hierbei wird im ersten Schritt ein Naphtholderivat gespalten, der in einem zweiten Schritt durch ein Diazoniumsalz wasserunlöslich zu einem Azofarbstoff reagiert. Enzymhaltige Zellen stellen sich rot dar. CAE ist hierbei spezifisch für Zellen der granulozytären Linie (KASS, 1979). Beim Rind können hiermit neutrophile Granulozyten dargestellt werden. ANA stellt Lysosomen dar, wie sie in großen Mengen in Makrophagen vorkommen.

In gleicher Weise funktioniert der Nachweis der sauren Phosphatase, die ebenfalls in Lysosomen zu finden ist. Er basiert ebenfalls auf der simultanen Azokopplung. Je nach eingesetztem Farbstoff stellen sie sich rot oder ockerfarben dar (HERMANN, 1987). Der Nachweis von Peroxidase bedient sich der gleichen Reaktion wie in der Immunhistologie durch die Meerrettichperoxidase. Die Umsetzung von Diaminobenzidin als Substrat durch die endogene Peroxidase der Makrophagen führt zu Ablagerungen von rehbraunem Diaminobenzidinbraun (LOJDA et al., 1976).

Ursprünglich nur zu Forschungszwecken verwendet, wird die Immunohistochemie in den letzten 40 Jahren stetig zunehmend in der Diagnostik angewandt (WALKER, 2006). Sie beruht auf der Detektion von Zellstrukturen (Antigen) durch enzym- bzw. fluorochrommarkierte Antikörper, die direkt durch ein an den Antikörper gebundenes Farbreagenz oder indirekt durch ein an einen zweiten Antikörper gebundenes Farbreagenz sichtbar gemacht werden. Zu den Zellstrukturen gehören die Cluster of Differentiation (CD). CD 3 Antigen ist ein Rezeptor der T-Lymphozyten (ABBONDANZO, 1999). CD 20 und CD 79a Antigene sind Vertreter des Major Histocompatibility Complex (MHC) der Klasse II, der zur Immunerkennung auf der Zellmembran von B-Lymphozyten exprimiert wird (PEREZ-MARTINEZ et al., 2002).

Myeloid/Histiozyten Antigen Clone 387 (MAC 387) ist ein Antikörper, der ein

Membranprotein der S100 Familie auf Monozyten erkennt. Hauptsächlich bindet er an Makrophagen, kann aber auch an andere Zellen der Monozyten-Zelllinie binden, sofern sie S100 Membranprotein exprimieren (BRANDTZAEG et al., 1988).

Der Nachweis von *Vimentin*, einem Protein des Zytoplasmas, das ubiquitär in mesenchymalen Zellen vorkommt, dient der Detektion von Fibroblasten, ebenfalls Zellen mesenchymalen Ursprungs, die in Zellkulturen die eigentlich zu kultivierenden Zellen verdrängen können (BOHN et al., 1992). Zytokeratine sind eine Familie von intermediären Filamenten des Zytoskeletts in Epithelgewebe. Die Bindung von fluorochrommarkierten Antikörpern gegen *Zytokeratin* identifiziert Epithelzellen endometrialen Ursprungs und dient der Identitätskontrolle (EICHNER et al., 1984).

Die zytologischen Untersuchungen am Uterus werden aus der Flüssigkeit einer uterinen Spülung oder aus dem Ausstrich eines Bürstchenabstrichs durchgeführt. Letzteres ist als Cytobrushmethode bekannt (WESTERMANN et al., 2010).

Bei der uterinen Spülung wird ein geringes Volumen einer physiologischen Spülflüssigkeit transcervical mittels eines Katheters in den Uterus gegeben. Nach kurzer transrektaler Massage des Organs wird sie durch denselben Katheter wieder zurückgewonnen. Im Anschluss werden die in der Spülflüssigkeit enthaltenen Zellen mittels einer Zytocentrifuge auf einen Objektträger konzentriert (GILBERT et al., 2005). Die Auswertung ist analog wie bei der zytologischen Beurteilung durch die Cytobrushmethode (KASIMANICKAM et al., 2005).

Zur Gewinnung der zytologischen Proben nach der Cytobrushmethode wird ein Bürstchen unter transrektaler Kontrolle transcervical den Uterus eingeführt. Das Bürstchen, an der Spitze eines in einem beweglichen Katheter befindlichen Metallmadrins, wird im Uterus aus dem Katheter geschoben, mit einer Drehbewegung an der Uteruswand abgestrichen und anschließend in den Katheter zurückgezogen (PLONTZKE et al., 2010). Nach der Entnahme wird das Bürstchen auf einem Objektträger abgerollt. Zur Auswertung unter dem Mikroskop werden die Zellen fixiert, angefärbt, bei einer Vergrößerung von 400 ausgezählt (100 Zellen) und abschließend der Anteil von PMN in Prozent der Gesamtzellzahl zellkernhaltiger Zellen ausgedrückt (KASIMANICKAM et al., 2005).



#### 4.4. Molekularbiologische Verfahren

Real Time PCR ist eine sehr sensitive Methode, um geringste Mengen von DNA oder RNA zu detektieren. Sie wird inzwischen für verschiedene Anwendungen, wie der klinischen Diagnose von Erb- und Infektionskrankheiten oder der Analyse der gewebespezifischen Genexpression genutzt (KAYIS et al., 2011).

Die RNA Extraktion hat sich in den letzten Jahren stetig weiter entwickelt. So gibt es heute verschiedene Möglichkeiten RNA zu gewinnen. Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Festphasenaufreinigung wird die Gesamt-RNA (tRNA: total RNA) im vorab aufgeschlossenen Zelllysate durch selektive Bindung an eine spezifische Säulenmatrix isoliert. Durch die spezifische Matrix der Säule kommt es zu Affinitäts- und Größenausschlüssen, unter chaotropen Bedingungen zu Wasserstoffbrückenbindungen und in wässrigen Lösungen zu Ionenbindungen an die Matrix. Nach intensiven Waschschritten wird die tRNA von der Matrix gelöst (TAN & YIAP, 2009) und als konzentriertes Eluat aufgefangen. Dieser Methode steht eine ganze Reihe von konventionellen Flüssig-Flüssig-Phasen Aufreinigungen gegenüber (ULBRICH et al., 2011).

Da sich die Gewebe untereinander und in einer Art auch bei gleicher Behandlung in Qualität und Quantität unterscheiden, empfiehlt sich vor Durchführung der PCR eine Qualitätskontrolle (EL-NAGGAR, 2002). Bei der klassischen PCR konnte man dies anhand einer der RNA-Gewinnung folgenden Gelelektrophorese berücksichtigen. Dieser Technik entspricht heute die Mikroelektrophorese, die sich durch einen verringerten Aufwand und höheren Automatisierungsgrad auszeichnet (HULKOVA & ZEMAN, 2011). Die Elektrophorese wird in einem Mikrochip durchgeführt, bei dem das Gel gleichmäßig über Kapillare in die Reaktionsräume gepresst wird. Da dies auf kleinstem Raum geschieht, reichen für die Durchführung geringe Mengen Probe (im  $\mu\text{g}$  Bereich) (NEUHOFF, 2000). Bei der anschließenden Auswertung kann neben der Integrität der RNA auch die Quantität bestimmt werden. Zur Überprüfung der Qualität und Menge von Nukleotidsequenzen eignen sich auch Spektrophotometer (TANG et al., 2012).



### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Histologische Untersuchungen**

##### **1.1. Untersuchungsmaterial und Entnahmezeitraum für die Histologie**

Das für die Untersuchung verwendete Gewebe entstammt Uteri von Schlachttieren des Schlachthofs Buchloe. Sie wurden im Zeitraum von November 2010 bis September 2011 gesammelt. Die Tiere wurden adspektorisch hinsichtlich Ernährungszustand und Euter beurteilt. Ausgeschlossen wurden Tiere, die Unterernährung, schlechten Allgemeinzustand und offensichtliche orthopädische Probleme aufwiesen. Ebenso Tiere mit Auffälligkeiten am Euter wie Wunden, Hautveränderungen und Milchfluss.

Für Gruppe 1 „Färsen“ wurden Uteri von 14 klinisch geschlechtsgesunden Färsen ausgewählt. Sie wiesen alle einen Blütegelbkörper von minimal 2 cm und maximal 3,5 cm auf. Das kleinste Ovar war 2x2x3 cm und das größte 6x4x3 cm groß. Die Tiere waren bei Schlachtung durchschnittlich 33 Monate alt (Min/Max: 24/42 Monate). Die Uteri waren anatomisch normal ausgebildet, die Hörner symmetrisch. Es konnten makroskopisch keine Veränderungen am Endometrium festgestellt werden.

Für die Gruppe 2 „Klinische Endometritis und Pyometra“ wurden Uteri von 8 Kühen und 2 Färsen gesammelt, deren Uteri eine deutliche Flüssigkeitsansammlung und meist eine Asymmetrie aufwiesen. Gleichzeitig hatten alle Tiere einen Blütegelbkörper. Die Tiere zeigten keinen Cervicalausfluss. Die Kühe hatten im Schnitt 3,2 Kälber. Sie waren vier bis 28 Monate nach Abkalbung, wobei der Durchschnitt bei 9 Monaten lag. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug 60 Monate (Min/Max: 18/112).

Für Gruppe 3 „Verdacht auf subklinische Endometritis“ wurden Uteri von 15 äußerlich gesund erscheinenden Kühen gesammelt. Die Uteri waren normal anatomisch ausgebildet. Die Hörner waren symmetrisch angelegt und wiesen keine Füllung auf. In drei Fällen war das Endometrium hyperämisch. Die restlichen Organe zeigten ein unauffälliges Endometrium. Am Ovar befand sich bei allen Tieren ein Blütegelbkörper mit einem Durchmesser von durchschnittlich 2,5 cm. Die Tiere waren bei Schlachtung ein bis 21 Monate nach Abkalbung, im Durchschnitt sieben Monate. Die Tiere hatten im Schnitt 2,5 Kälber

(Min/Max:1/5). Im Durchschnitt waren die Kühe 69 Monate alt (Min/Max: 40/96).

## **1.2. Präparation des Gebärmuttergewebes für Histologie, Enzymhistologie und Immunhistologie**

Die Entnahme der Uteri erfolgte am Schlachtband direkt nach der Eröffnung des Bauchraums. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Organe an einem eigens dazu bereitgestellten Arbeitsplatz abseits des Schlachtbandes bearbeitet.

Zunächst wurden die Uteri von den *Ligamentii* (exklusive *intercornuale*) freipräpariert, danach mit einer Waage auf 100 g genau gewogen und mit einem Maßband vermessen. Zur Veranschaulichung des weiteren Verfahrens dient die Abb.1, S. 21.

Für die bakteriologische Untersuchung wurde ein Horn unter sterilen Kautelen mit PBS gespült. Dazu wurde mit einem sterilen Skalpell im Bereich der *Ligamentii intercornuale* an der Bifurcation eingestochen und ein Schenkel einer Darmklemme durch das entstandene Loch geführt. Der zweite Schenkel wurde angelegt, sodass man das rechte Horn abklemmen konnte. Anschließend wurden mit einem Gasbrenner eine Stelle direkt über der Klemme und eine zweite Stelle kurz vor der Salpinx für etwa drei Sekunden abgeflammt, sodass die Oberfläche denaturierte. Nach Inokulation von 20 ml PBS mit steriler Spritze und Kanüle an der Salpinx-nahen Stelle in das Uteruslumen konnte die Spülflüssigkeit an der bifurkationsnahen Stelle wieder gewonnen werden (Abb.1 S.21, A). Für die histologische Auswertung wurden die Hörner in jeweils drei Segmente unterteilt (Abb.1, A; durch blaue Markierung begrenzt). Von diesen Segmenten wurde mit einem Skalpell Gewebe entnommen. An dem dorsocaudalen Ende der Segmente wurde eine Markierung mit Hilfe eines Tackers angebracht und anschließend an der dorsalen Seite aufgeschnitten (Abb.1, B). Danach wurden die Segmente flach auf Styropor mit Kanülen fixiert und mit der endometrialen Seite nach unten in einen mit 4%-igem Paraformaldehyd gefüllten Transportbehälter überführt (Abb.1, C und D). Aus den Zwischensegmenten (Abb.1, A grüne Markierung) wurde der Bürstchenabstrich für die Zytologie entnommen. Hierzu wurde das Lumen mit einer Pinzette gespreizt, die Bürstchen in das Lumen eingeführt, gedreht und wieder entnommen.

Nach einer Fixationszeit von 24 h wurden etwa 10x5 mm große Stücke aus den zugehörigen Lokalisationen geschnitten (Abb.1, E), unter Beibehaltung der

Orientierung in Einbettungskassetten überführt und für weitere 24 h in 4%-igem Paraformaldehyd fixiert (Abb.1, F und G) (*Lösungen Anhang IX.1.1. S.159*).

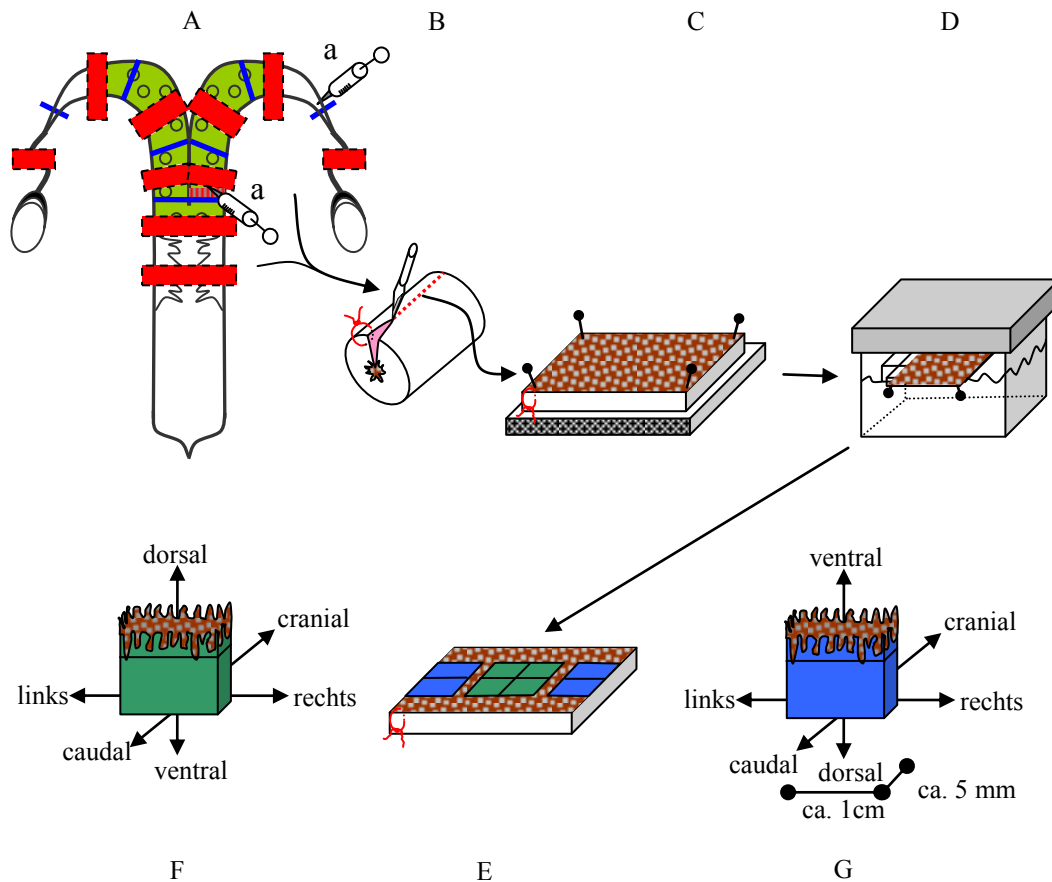


Abb.1: Probengewinnung für die histologische, zytologische und bakteriologische Untersuchung; A = Gesamtorgan; ○ = Karunkeln; blaue Striche = Segmenteinteilung; rote Flächen = Gewebe für die Histologie; dazwischen liegende grüne Flächen = Zwischensegmente für zytologischen Proben; rot gestrichelte Linie an der rechten Hornbasis = Klemme für die Spülproben; a = Einstichstellen für die Spülproben (Bakteriologie); B = Gewebesegment für Histologie nach Markierung dorsocaudal (roter Faden); Eröffnung; C = auf Styropor fixiertes eröffnetes Gewebesegment; D = Transportbehälter und erste Fixation in Paraformaldehyd; E = Schneideschema für die histologischen Proben; F und G = histologische Proben mit Orientierung, die bis zum fertigen Schnitt beibehalten bleibt

### 1.3. Einbettungsverfahren, Schnittherstellung und Färbungen bei Paraffineinbettung

#### 1.3.1. Einbettung

Für die Immunhistochemie werden zur besseren Epitopanlagerung der Antikörper Paraffinschnitte verwendet.

Das Entwässern und die Einbettung der Proben fanden in einem Einbettungsautomaten statt. Das Gewebe wurde in folgenden Schritten behandelt:

- 30 min spülen mit A. dest.
- 2x1,5 h 70%iges Äthanol
- 2x1,5 h 96%iges Äthanol
- 2x1,5 h 100%iges Äthanol
- 2x30 min Xylol
- 1,5 h Xylol
- 2 h Paraffin 60°C
- 3 h Paraffin 60°C

Nach dem Ausgießen der Proben in Paraffinblöcke wurden mittels eines Rotationsmikrotoms 2-4 µm dicke Schnitte erstellt. Diese wurden bei 40°C im Wasserbad gestreckt, auf Objektträger aufgezogen und für mindestens 24 h bei 40°C im Trockenschrank getrocknet.

Mittels einer 15-minütigen Inkubation in Xylol wurden die Schnitte entparaffinisiert und konnten nach dem Durchlaufen einer absteigenden Alkoholreihe (2x100%iges, 2x96%iges, 70%iges Äthanol, 2x A. dest.) angefärbt werden (vgl. *Geräte Anhang IX.3.1 S.179*)

### 1.3.2. Immunhistochemie

Es wurden folgende Antikörper verwendet:

**Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper für die Immunhistologie**

Bezeichnung/Klon	Spezifität	Zielzellen
Anti-CD3 polyklonal	CD 3	T-Lymphozyten
Anti-CD20 polyklonal	CD20	B-Lymphozyten
HM57	CD68	Makrophagen
SPM281	CD79a	B-Lymphozyten
MAC387	Calprotectin	Makrophagen

Die Antikörper gegen CD3, CD20, CD79a und Calprotectin wurden routinemäßig am Institut für Tierpathologie beim Rind, LMU München, angewandt. Für den noch nicht etablierten Antikörper HM57 (anti CD68) wurden unterschiedliche Protokolle getestet.

**Tabelle 2: Ablauf-Protokoll der Immunhistochemie für Antikörper unterschiedlicher Spezifität.**

	CD 3	CD20	CD79a	Calprotectin	CD68
• Trocknung der Schnitte im Trockenschrank bei 37°C über Nacht	✓	✓	✓	✓	✓
• Entparaffinisierung in Xylol für 15 min	✓	✓	✓	✓	✓
• Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe	✓	✓	✓	✓	✓
• Demaskieren mit TBS/EDTA pH 9,0 für 2x10 min in Mikrowelle	✓		✓		*
• Blockierung der endogenen Peroxidase 10 min in 1%igem Wasserstoffperoxid, Spülen für 10 min in TBS pH 7,6	✓	✓	✓	✓	✓
• Demaskieren mit Proteinase K				✓	*
• Spülen für 10 min in TBS pH 7,6.					
• Normalserum <sup>*1</sup> , Verdünnung 1:10 für 30 min, Spülen für 10 min in TBS pH 7,6.	✓	✓	✓	✓	✓
• Inkubation mit Primärantikörper für 1 h, Spülen in TBS, pH 7,6 für 10 min	✓	✓	✓	✓	✓
• Inkubation mit Peroxidase markierten Sekundärantikörper absorbiert mit 5% Rinderserum 40 min				✓	*
• Inkubation Biotin markierten Sekundärantikörper absorbiert mit 5% Rinderserum 40 min	✓	✓	✓		*
• Spülen in TBS, pH 7,6 für 10 min					
• Inkubation mit ABC-Komplex für 30min.	✓	✓	✓		✓
• Spülen in TBS, pH 7,6 für 10 min	✓	✓	✓		✓
• DAB-Gebrauchslösung ca. 5 min, Spülen mit fließend Leitungswasser 5 min.	✓	✓	✓	✓	✓
• Gegenfärbung mit Mayers Hämalaun 1min., Spülen mit fließend Leitungswasser 5 min	✓	✓	✓	✓	✓
• Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe	✓	✓	✓	✓	✓
• Einstellen der Schnitte in Xylol, eindeckeln	✓	✓	✓	✓	✓

Die speziell bei jeder Antikörpermarkierung durchgeführten Arbeitsschritte sind gekennzeichnet. Die Primär- und Sekundärantikörper sowie die Verdünnungen

<sup>1</sup> \* Für die Absättigung von elektrostatischer Ladung im Gewebe und zur Verminderung unspezifischer Anfärbung wurde mit Normalserum inkubiert.

und Herstellernachweis sind im *Anhang IX.1.4. S. 162* aufgeführt.

#### **1.4. Einbettungsverfahren, Schnittherstellung und Färbung bei Kunststoffeinbettung**

Die Proben wurden wie in Kap.1.2 beschrieben hergestellt und in einem Einbettungsautomaten nach folgender Prozedur entwässert:

- 1 x 3 h Spülflüssigkeit
- 2 x 1 h 50%-iges Äthanol
- 2 x 2 h 70%-iges Äthanol
- 2 x 2 h 96%-iges Äthanol
- 2 x 2 h 96%-iges Äthanol
- 2 x 3 h 96%-iges Äthanol

Anschließend wurden die Proben in der Einbettungskassette in ein erstes Einbettungsmedium, ein 1:1 Kunststoffmonomergemisch aus Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (GMA) und Methacrylsäuremethylester (MMA), überführt und für 24h bei 4°C auf einem Taumler inkubiert.

Nach der Überführung der Einbettungskassette in ein zweites Einbettungsmedium (Lösung A; *Anhang IX.1.5. S.162*) erfolgt eine weitere Inkubation für 4 h bei 4°C auf einem Taumler. Für die Polymerisation wurden die Proben aus der Einbettungskassette entnommen und in einen luftdicht schließenden Polyethylen-Probenbehälter überführt. Zum Start der Polymerisation wurde die zurückbleibende Lösung A mit N,N-Dimethylanilin-Lösung versetzt und kurz intensiv gemischt. Anschließend wurde die Probe mit dem Reaktionsgemisch übergossen. Zum Ableiten der Polymerisationswärme wurden die Behälter in eine mit etwa einem Zentimeter Wasser gefüllte Wanne gestellt und bei 4°C über Nacht aufbewahrt.

Die erhärteten und aus den Polyethylen-Behältern entnommenen Blöcke wurden auf einem Hartschnittmikrotom bei 1µm Schnittdicke geschnitten. Zum Strecken wurden die Schnitte in ein 60°C heißes Wasserbad überführt, auf Objektträger aufgezogen und auf einer Heizplatte (60°C für mindestens 10 min) vorgetrocknet. Die Schnitte wurden anschließend zur besseren Fixierung auf dem Objektträger bei 60°C für 24 h in einem Trockenschrank endgetrocknet und standen anschließend zur Färbung bereit (vgl. *Geräte Anhang IX.3.1.S.179; Lösungen IX.1.5. S.162*).



### 1.4.1. Histochemie

#### 1.4.1.1. Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung (HE) ist eine Übersichtsfärbung. Im ersten Schritt werden Zellkerne mit einer Hämalaun-Lösung blau angefärbt. Durch Zugabe einer Eosin-Phloxin-Lösung färben sich Gewebestrukturen wie Eiweiße im Zytoplasma und extrazellulärer Matrix, Kollagen, Keratin und kernlose Zellen differenziert rot an und ermöglichen somit eine kontrastreiche Darstellung der untersuchten Strukturen. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.6. S.163*):

- 5 min Einstellen in Hämalaun sauer, nach Mayer
- 10 min Wässern in fließendem Leitungswasser
- ca. 2 s Differenzieren in 1%-igem HCL-Alkohol
- 10 min Wässern unter fließendem Leitungswasser
- Entfernen großer Wassertropfen mittels Filterpapier, anschließend ca. 2min auf einer Heizplatte bei 60°C trocknen
- 20 min Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung
- 2x2 s spülen in A. dest.
- Entfernen großer Wassertropfen mittels Filterpapier, anschließend ca. 2min auf einer Heizplatte bei 60°C trocknen
- Verbringung in Xylol
- eindeckeln mit Coverquick®

#### 1.4.1.2. Giemsa-Färbung

Bedingt durch das metachromatische Färbeverhalten der Leukozyten eignet sich die Giemsa-Färbung im Besonderen zur Leukozytendifferenzierung. So stellen sich Leukozyten, Plasmazellen und Mastzellen charakteristisch dar. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.6. S.163*):

- 1,5 h Giemsa-Gebrauchslösung im Wasserbad bei 65°C
- 2 s Phosphat-Puffer
- 2x2 s spülen in A. dest.
- Entfernen großer Wassertropfen mittels Filterpapier, anschließend ca. 2min auf einer Heizplatte bei 60°C trocknen
- Verbringung in Xylol
- Eindecken mit Coverquick®

#### 1.4.1.3. Perls-Färbung

Die Berlinerblau-Reaktion nach Perls ist ein histochemischer Nachweis von dreiwertigen Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Die Färbung dient zum Nachweis von Hämosiderin phagozytierenden Makrophagen, sogenannten Siderophagen. Hämosiderin ist ein

Fe<sup>3+</sup>haltiges intrazelluläres Abbauprodukt von Hämoglobin. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.6. S.163*):

- 2 min einstellen in Gebrauchslösung
- Schnitte 3x mit A. dest. spülen
- bei 60°C die Schnitte auf der Heizplatte trocknen
- 15 min einstellen in Kernechtrot
- Schnitte 3x mit A. dest. spülen
- bei 60°C die Schnitte auf der Heizplatte trocknen
- Verbringung in Xylol
- eindeckeln mit Coverquick®

#### 1.4.2. Enzymhistochemie

Insgesamt wurden vier verschiedene enzymhistochemische Färbungen durchgeführt. Die Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase (CAE), die  $\alpha$ -Naphthyl-Acetate Esterase (ANA)- sowie die saure Phosphatase Färbung wurden an Kunststoffschnitten durchgeführt, die Peroxidase-Färbung an Paraffinschnitten.

##### 1.4.2.1. Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase (CAE)-Färbung

Mit der CAE-Färbung kann spezifisch Esterase aus neutrophilen Granulozyten sowie Mastzellen durch eine kräftig rote Färbung im Zytoplasma kenntlich gemacht werden. Hierbei setzt nur Esterase aus PMN und Mastzellen, nicht jedoch aus Monozyten, aus dem Substrat eine Naphthol-Verbindung frei, welche mit einem Diazoniumsalz zu einem unlöslichen rot-violetten Farbstoff reagiert. Die Durchführung erfolgte am Kunststoff-Schnitt. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.7 S.164*):

- Anmischen von Naphthol-AS-D Chloracetat und N,N-Dimethylformamid (Lösung B)
- gründliches (1 min) Anmischen von Natriumnitrit und Pararosanilin, sodass eine goldbraune Färbung und Chlorgeruch entsteht. Nach Zugabe von Phosphatpuffer entsteht Lösung A
- Färbelösung fertigstellen: Lösung A wird unter Schwenken sofort zu Lösung B gegeben, sodass eine Rotfärbung auftritt
- pH Wert mit HCl/NaOH auf 6,3 einstellen
- die Schnitte für 4 h bei 7°C in Färbelösung einstellen
- unter fließendem Aqua dest. spülen und mit Coverquick® eindeckeln

#### 1.4.2.2. a-Naphtyl-Acetat Esterase (ANA)-Färbung

Das Substrat a-Naphtyl-Acetat der ANA-Färbung wird durch Esterasen der Monozyten zusammen mit einem Diazoniumsalz zu einem unlöslichen roten Farbstoff umgesetzt. Monozyten färben sich daher mit der ANA Färbung intensiv rot. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.7 S.164*):

- a-Naphtyl-Acetat und Ethylglykolmonomethylether werden gemischt (Lösung B)
- Natriumnitrit und Pararosanilin werden gründlich gemischt und nach etwa 60 s der Phosphatpuffer hinzugegeben (Lösung A)
- Lösung A wird unter Schwenken sofort zu Lösung B gegeben
- der pH wird mit HCl/NaOH auf 6,5 eingestellt
- die Schnitte werden für 24/48 h bei 7°C in die Gebrauchslösung eingestellt, Substratwechsel alle 8 h
- unter fließendem A. dest. spülen und mit Coverquick® eindecken

#### 1.4.2.3. Saure-Phosphatase-Färbung

Mit der Sauren-Phosphatase-Färbung werden Makrophagen angefärbt. Die Durchführung erfolgte am Kunststoff-Schnitt. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.7 S.164*):

- Naphthol-AS-BI-Phosphat in N,N-Dimethylformamid lösen (Lösung B)
- Natriumnitrit und Pararosanilin werden gründlich gemischt, nach etwa 60s Veronal-Acetat-Puffer hinzugeben (Lösung A)
- Lösung A wird unter Schwenken sofort zu Lösung B gegeben
- der pH wird mit HCl/NaOH auf 5,0 eingestellt
- die Schnitte werden für 24/48 h bei 7°C in die Gebrauchslösung eingestellt, Substratwechsel alle 8 h
- unter fließend A. dest. spülen und mit Coverquick® eindecken

#### 1.4.2.4. Peroxidase-Färbung

Mit der Peroxidase-Färbung wird die endogene Peroxidase von Makrophagen angefärbt. Die Durchführung erfolgte am Paraffin-Schnitt. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.7 S.164*):

- für 3 h in DAB-Gebrauchslösung einstellen
- unter fließendem A. dest. spülen und für 10 min auf der Heizplatte 60°C trocknen
- einstellen in Xylol und mit Coverquick® eindecken

### 1.4.3. Auswertung der histologischen Schnitte

Die deskriptive und semiquantitative Auswertung der histologischen Schnitte erfolgte an einem Stereomikroskop. Die deskriptive Auswertung wurde immer von zwei, zeitweise auch drei Untersuchern gleichzeitig durchgeführt. Die Ergebnisse wurden unabhängig voneinander unmittelbar schriftlich festgehalten und im Anschluss diskutiert.

Die semiquantitative Untersuchung wurde von einem Untersucher durchgeführt; die Schnitte wurden doppelt ausgewertet. Die Ergebnisse wurden in einem speziell entwickelten Protokollformular (*Anhang IX.1.8 S.166.*) festgehalten.

### 1.5. Zytologische Untersuchung

Wie in Kap. 1.2. dargestellt, wurden die zytologischen Proben vor Ort aus den Zwischensegmenten bei der Präparation gewonnen. Für den intrauterinen Bürstchenabstrich wurden autoklavierte Cytobrush Abstrichbürstchen verwendet (*Anhang IX.3.1. S.179*). Ein Bürstchen wurde in das mittels Pinzette geöffnete Lumen der Hornteilstücke eingeführt und einmal um 360° gedreht. Es folgte der Abstrich mit je einer 180° Drehung auf 2 Objektträgern. Im Labor wurden die Abstriche mit Aceton fixiert und nach der Pappenheimer-Schnellfärbung angefärbt. Die hier für den Abstrich durchgeführte Pappenheimer-Schnellfärbung ist ursprünglich eine Routinefärbung für Blutastriche. Sie färbt neutrophile, basophile und eosinophile Leukozyten gleichermaßen. Die Durchführung erfolgte nach folgendem Schema (*Lösungen Anhang IX.1.10. S.176*):

- Schnitte mit 1 ml Wright-Lösung beträufeln; für 1 min einwirken lassen
- 1 ml A. dest. auf die Wright-Lösung geben und leicht pusten, bis eine metallisch glänzende Oberfläche zustande kommt; 2-4 min auf die Schnitte einwirken lassen
- kräftig mit A. dest. spülen
- Die Rückseite der Objektträger mit 1%igem HCl-Äthanol reinigen
- Einstellen in Xylol
- mit Coverquick® eindecken

Die Auswertung wurde mit einem Lichtmikroskop bei 400facher Vergrößerung durchgeführt. Um den Anteil an PMN festzustellen, wurden 100 zellkernhaltige Zellen ausgezählt.

### 1.6. Bakteriologische Untersuchung

Die bakteriologischen Untersuchungen wurden am Institut für Infektionsmedizin

und Zoonosen, Lehrstuhl für Bakteriologie und Mykologie unter Anleitung durchgeführt. Wie in Abb.1 gezeigt, wurde vom rechten Uterushorn mit Kochsalzlösung eine Spülprobe gewonnen. Die Spülproben wurden auf Eis in das Institut transportiert, dann bei +7°C gekühlt und innerhalb von 24 h ausgestrichen.

#### **1.6.1. Methodik**

Aus der Spülflüssigkeit wurden mit einer Pipette 100µl auf eine halbe Kulturplatte überführt und ausgestrichen. Daraufhin folgte ein zweifacher Ösenausstrich auf der verbleibenden Hälfte. Es wurden je Probe drei Platten beimpft, für die aerobe Bebrütung eine Schafblutplatte sowie eine CNA-Columbia Blutplatte, für die anaerobe Bebrütung eine Schafblutplatte. Anschließend wurden die Platten aerob für 72 h und anaerob (CO<sub>2</sub>, luftdichter Beutel) für 48 h bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Bei Wachstum verschiedener und überwuchernder Kolonienarten wurde jeweils eine Kolonie subkultiviert. Die semiquantitative Auswertung wurde anhand der Ösenausstriche durchgeführt (*vgl. Anhang IX.1.9. S.175*). Zur qualitativen Auswertung wurde jeder Kolonientyp mittels MALDI-TOF differenziert.

#### **1.6.2. MALDI-TOF**

MALDI-TOF ist eine Kombination aus der Matrix-unterstützten Laser-Ionisation und einem Massenspektrometer mit Flugzeitanalysator. Hierbei wird zunächst eine Reinstkultur mit einem Laser in einem Vakuum verdampft. Durch das Vakuum steigen die verdampften Proteine auf und werden an einem Massenspektrometer vorbeigeführt. Die sich ergebenden Proteomprofile werden nun als Referenz hinterlegt. Nun kann das Proteomprofil eines Isolates mit den hinterlegten Profilen verglichen werden. Der Grad der Kongruenz wird mittels Software ermittelt.

Zur Durchführung wird eine Kolonie mit einem zugespitztem Stab auf einer Targetposition verteilt, anschließend mit 1-2 µl Matrix überschichtet und in das MALDI-TOF Analysegerät überführt (*vgl. Geräte IX.1.9. S.179*).

## **2. Untersuchungen an endometrialen Explants**

### **2.1. Zeitraum, Ort und Untersuchungsmaterial für Explant-Versuche**

Die methodischen Voruntersuchungen fanden von Juni bis November 2010 statt, der Hauptversuch von März bis Mai 2012. Die Organe für die Gewebepräparation entstammen dem Schlachthof München. Für die Hauptversuche wurden ausschließlich Uteri von Färsen (n=17) verwendet. Die Tiere waren durchschnittlich 29 Monate alt (Min/Max.: 25/43 Monate). An allen Ovarien zeigte sich jeweils ein prominenter Gelbkörper. Die Uteri wiesen eine anatomisch normale symmetrische Form auf. Das Endometrium war blassrosa; die Karunkeln hatten im Durchschnitt einen Durchmesser von 5 mm. Keines der Tiere zeigte abweichenden zervikalen Ausfluss.

### **2.2. Präparation des Gewebes und Erstellung von Explants**

Für die Gewinnung von Explants wurden Uteri auf Höhe der Portio vaginalis Uteri durch einen Schnitt mit einem sterilen Skalpell von der Vagina und dem Ligamenti latum Uteri getrennt. Mit einem weiteren Schnitt wurden die Uteri von den verbleibenden Ligamentii (exklusive intercornuale) frei präpariert, dann im Bereich des Gebärmutterhalses ligiert, in wasserdichte Plastikbeutel verpackt und in eine Kühlkiste verbracht. Dort waren sie vollkommen vom Eis umschlossen.

Nach dem etwa einstündigen Transport in die Klinik für Wiederkäuer der LMU München wurden die Uteri aus den Plastikbeuteln entnommen. Mit jeweils zwei Nadeln wurden der Corpus-Uteri und die Uterus-Hörner jeweils auf einer sterilen Unterlage befestigt.

Die Hörner wurden mit einem Skalpell bis auf das Endometrium eröffnet. Mit dem Schenkel einer sterilen Schere wurde das Endometrium durchstoßen und so das Lumen eröffnet. Die Gebärmutterhörner wurden unter Zug nach dorsal aufgeschnitten. Während des Schneidens wurden die Schnittländer mit Nadeln nach außen hin festgesteckt, sodass das Endometrium flach aufgespannt war.

Mit einer sterilen anatomischen Pinzette wurde das Endometrium an einer Karunkel erfasst, angezogen und unterhalb der Karunkel mit einem sterilen Skalpell eingeschnitten. Nun wurde das Endometrium unter ständigem Zug abpräpariert. Nach Abtrennung des Gewebestücks mit einem Schnitt erfolgte die Überführung in steriles PBS.

Alle weiteren Arbeiten zur Explantgewinnung erfolgten dann an einer

Sicherheitssterilbank. Alle verwendeten Gerätschaften entsprachen sterilen Kautelen.

Zum Schneiden der Explants mit einer Kantenlänge von 1 mm wurde ein McIlwain Tissue Chopper® verwendet. Das Gewebe wurde aus dem PBS entnommen, auf ein steriles Schneidebrettchen überführt und mit 500 µl PBS feucht gehalten. Anschließend wurden serielle Schnitte im Abstand von 1mm durchgeführt. Nach einer 90°-Drehung des Spannfutters und erneutem Schneiden im Abstand von 1mm entstanden Explants mit einer Grundfläche von 1x1 mm. Aus einem Gewebestück konnten etwa 100 Explants erstellt werden. Um sie in eine mit 150 µl Medium pro Well befüllte 96-Well-Microtiterplatte zu überführen, wurden die Explants einzeln mittels einer Feinpinzette aus Federstahl aufgenommen und im Medium abgesetzt.

Für Stimulationsexperimente wurde das Medium mit 3 µg/ml LPS und 5 ng/ml Progesteron versetzt. Die Explants wurden bei 5%CO<sub>2</sub> inkubiert (*Geräte Anhang IX.3.1. S.179, Lösungen Anhang IX.2. S.177*).

### **2.3. Physiologische, histologische und molekularbiologische Untersuchungen an endometrialen Explants**

#### **2.3.1. PMN-Migrations-Bioassay**

Nach einer dem Versuchsansatz entsprechenden Inkubation der Explants mit und ohne Stimulation wurde der Kulturüberstand hinsichtlich der Fähigkeit getestet, eine PMN Wanderung auszulösen (Chemotaxis). Hierzu wurde der Überstand eines Doppelansatzes mit einer Pipette abgenommen und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Bis zur weiteren Verarbeitung in der Migrationskammer wurde die Probe bei -82°C aufbewahrt.

Für die Isolierungen von PMN wurde von klinisch unauffälligen Kühen mit dem Vacutainer®-System heparinisiertes Blutplasma gewonnen. Die PMN wurden mittels einer Biocoll® Dichtegradientenzentrifugation isoliert und im Migrationskammerversuch analog nach LIND (2011) eingesetzt.

Zur Migration wurden die Kammern für 1 h in einem Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden sie auf Eis überführt und gekühlt weiter bearbeitet. Da nur der Teil der gewanderten Zellen ausgewertet wurde, konnte die eingesetzte Zellsuspension im oberen Kammerteil durch Abkippen verworfen werden. Anschließend wurden die Schrauben geöffnet und die Deckplatte mit der

Membran und der Silicondichtung abgenommen. Die Flüssigkeit der Wells in der Bodenplatte wurde resuspendiert und in den Siebdeckel (Maschenweite 30 µm) eines FALCON-Tubes überführt und bei 400xg für 10 s zentrifugiert.

Die Quantifizierung der gewanderten PMN Zellen fand mittels Durchflusszytometrie an einem Accuri C6 statt. Die Anzahl gewanderter Zellen wurde anschließend relativ zur parallel durchgeführten Positiv-Kontrolle (IL-8) gesetzt (*Geräte Anhnag IX.3.1, Lösungen Anhang IX.2.2. S.178*).

### **2.3.2. Vitalitätsbestimmung bei Explantpräparationen**

Der Test zur Vitalität mit dem wasserlöslichen Tetrazoliumsalz (WST-1-Lösung) wurde nach der vom Hersteller beschriebenen Methodik angewendet. Dazu wurde jene Konzentration gewählt, die bei Zellkulturen für den Proliferationstest mit  $2 \times 10^5$  ausgesäten Zellen genutzt wird. 10 µl der WST-1-Lösung wurden zu den entsprechenden Beprobungszeitpunkten im Doppelansatz zu den jeweiligen Kultivierungstypen gegeben und für 3 h inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstandes auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und photometrisch bei 450 nm ausgewertet. Die Daten wurden direkt in eine Excel-Tabelle übertragen.

### **2.3.3. Histologische Untersuchung an Explants**

Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden Explants aus zwei Wells entnommen, in eine Biopsiekapsel überführt und in 4%igem Paraformaldehyd für 24-48 h fixiert. Anschließend wurden sie, wie in Kapitel 1.3.1. beschrieben, in Paraffin ausgegossen, geschnitten und auf Objektträger gezogen. Die 2-4 µm dicken Schnitte wurden mit Hämalaun-Eosin, nach Giemsa und immunhistologisch gefärbt. Die Auswertung erfolgte an einem Stereolichtmikroskop bei einer 400fachen Vergrößerung.

#### **2.3.3.1. Histochemie**

##### **2.3.3.1.1. Hämalaun-Eosin Färbung**

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE) ist eine Übersichtsfärbung. Sie ermöglicht die Beurteilung von Gewebestrukturen und Zellen. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.2. S.159*):



- 10 min Xylol
- absteigende Alkoholreihe fünf Waschschr tte in Xylol, 2x100%iges, 2x96%iges, 70%iges  thanol)
- 5 min Mayer's Hämalaun
- 5 min warm wässern
- in 0,5%igem HCl-Alkohol differenzieren
- 5 min warm wässern
- 2-7 mal in Eosin tauchen
- in A. dest. spülen
- aufsteigende Alkoholreihe: 70%iges , 2x96%iges, 2x100%iges  thanol, fünf Waschschr tte in Xylol
- in Xylol überführen
- eindeckeln mit Coverquick®

#### **2.3.3.1.2. Giemsa Färbung**

Die Giemsa-Färbung dient der Identifikation von basophilen Zellen und Mastzellen, die Metachromasie zeigen. Fertig vorbereitete Schnitte wurden nach folgendem Färbeprotokoll behandelt (*Lösungen Anhang IX.1.2. S.159*):

- 10 min in Xylol
- absteigende Alkoholreihe fünf Waschschr tte in Xylol, 2x100%iges, 2x96%iges, 70%iges  thanol)
- 1 h bei 65 C in Giemsa-Gebrauchslösung
- in A. dest spülen
- ca. 1 s in 0,5%iger Essigsäure differenzieren
- 2 s in 96%igem Alkohol
- 2 s in 100%igem Alkohol
- in Xylol überführen
- eindeckeln mit Coverquick®

#### **2.3.3.2. Immunhistochemie**

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen der Explants wurden Vimentin und Zytokeratin dargestellt. Die Immunhistochemie wurde nach folgendem Schema durchgeführt.

**Tabelle 3: Protokoll für die immunhistochemische Analyse von Zytokeratin und Vimentin in Explantpräparaten**

	Zytokeratin <sup>1</sup>	Vimentin <sup>2</sup>
• Trocknung der Schnitte im Trockenschrank bei 37°C über Nacht	✓	✓
• Entparaffinisierung in Xylol für 15 min	✓	✓
• Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe	✓	✓
• Blockierung der endogenen Peroxidase ca. 10 min in 1%igem Wasserstoffperoxid K, spülen für 10 min in TBS pH 7,6		✓
• Demaskieren mit Proteinase, spülen für 10 min in TBS pH 7,6	✓	✓
• Normalserum, Verdünnung 1:10 für 30 min, spülen für 10min in TBS pH 7,6	✓	
• Inkubation mit Primärantikörper für 1 h, spülen für 10min in TBS pH 7,6	✓	✓
• Inkubation mit Peroxidase markierten Sekundärantikörper absorbiert mit 5% Rinderserum 40 min	✓	✓
• DAB-Gebrauchslösung ca. 5 min, spülen mit fließend Leitungswasser 5 min	✓	✓
• Gegenfärbung mit Mayers Hämalun 1 min, spülen mit fließend Leitungswasser 5 min	✓	✓
• Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe	✓	✓
• Einstellen der Schnitte in Xylol, Eindeckeln	✓	✓

Die speziell bei jeder Antikörpermarkierung durchgeführten Arbeitsschritte sind gekennzeichnet. Die Primär- und Sekundärantikörper sowie die Verdünnungen und Herstellernachweis sind im *Anhang IX.1.4. S.162* aufgeführt..

### 2.3.4. Molekularbiologische Untersuchung

Für den Nachweis eines Zellproduktes auf molekularbiologischer Ebene bedient man sich der Reversen Transkription von RNA. In der so gebildeten cDNA kann durch eine folgende quantitative real time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) das Zielgen nachgewiesen und mittels housekeeping-Genen oder Standardkurven relativ quantifiziert werden. Unterschiedliche Expressionslevel immunrelevanter Gene im Explantgewebe werden somit sichtbar.

#### 2.3.4.1. Extraktion und Bestimmung der Integrität der Gesamt-RNA

Für die Extraktion der gesamten RNA (tRNA) wurde ein kommerzielles RNA-

Isolationskit mit Absorptions-Zentrifugationsfilter (*Anhang IX.3.2. S.181*) verwendet.

### **Gewebelyse**

Die in RNAlater® bei –82°C konservierten Explants wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Nach Vorlage von 150 µl Lysispuffer zu einem Lysisröhrchen mit 6 Stück 2 mm Keramikbeads wurden fünf Explants hinzugefügt. Mittels eines Homogenisators (*Anhang IX.3.1. S.179*) erfolgte die Zerkleinerung in der Lyselösung in 2 Intervallen zu je 1 min bei einer Frequenz von 50 Hz. Um eine lokale Überhitzung zu vermeiden wurde zwischen den Intervallen eine Pause von 1min eingelegt.

### **RNA-Extraktion**

Die gesamte Extraktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Überstand aus dem Lysisröhrchen konnte ohne Filtration vorsichtig abgehoben und auf den ersten Filtersatz des Kits überführt werden. Nach der Bindung der DNA an die Filtermembran wird nach Zentrifugation (10.000xg; 2 min) das gewonnene RNA-haltige Eluat mit dem gleichen Volumen 70%igem Äthanol versetzt, mehrfach mit der Pipette gemischt und auf die zweite RNA-bindende Filtermembran gegeben. Diese wurde wiederum bei 10.000xg für 2min zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte: 1: 500 µl Waschlösung HS mit 50% Ethanolgehalt, anschließend Zentrifugation 10.000xg für 1 min; 2: 700 µl Waschlösung LS mit 80% Ethanolgehalt 10.000xg für 1 min. Nachdem die Membran mit 13.000xg, 2 min trocken zentrifugiert wurde, konnte durch eine Inkubation (1 min) mit 55 µl RNase-freiem Wasser die RNA gelöst und durch Zentrifugation bei 6.000xg für 1 min in ein Reaktionsgefäß überführt werden.

### **RNA-Integrität**

Die Bestimmung der Integrität und Menge der totalen RNA wurde mittels automatisierter Gelelektrophorese (Experion™System; Anhang) bestimmt. Das System besteht aus einem Chip für 12 Proben, einer Station für die Präparation des Chips und dem Analysator, in dem die eigentliche Gelelektrophorese stattfindet. Durch die digitale Aufarbeitung kann das Ergebnis neben der Wiedergabe als Datensatz, auch als Bild wie bei der klassischen Elektrophorese dargestellt werden. Dies ermöglicht eine schnelle Beurteilung zur erfolgreichen Durchführung der RNA Extraktion. Eine quantitative Bestimmung der Integrität fand an Hand des RNA-Quality Index (RQI) statt (RIEDMAIER et al., 2010). Der Index nimmt dabei Werte zwischen 1 (denaturierte RNA) und 10 (integre RNA)

an. Für die weitere Prozessierung wurden Proben mit einem RQI von >8 benutzt.

#### 2.3.4.2. Primer

Die Primer (Tab. 4) wurden aus bereits veröffentlichten Sequenzen übernommen oder für Ikb- und NFκB optimiert und von der Firma Biomers bezogen.

**Tab. 4: Verwendete Primer und deren Sequenz**

Primer	forward	reverse
<b>NFκB1</b>	TCAAACCTCCAGAATGGCAGA	GAAATCCTCTCTGTTTAGGTTGCTC
<b>IκB</b>	GTGGTCCGCCAAGTGAAGGG	TCACTAACCAGCCAGAAATCGCT
<b>CXCL8</b>	CCTCTTGTTCAATATGACTTCCA	GGCCCACTCTAAATAACTCTC
<b>UBQ3</b>	AGATCCAGGATAAGGAAGGCAT	GCTCCACCTCCAGGGTGAT
<b>Histone H3</b>	ACTGCTACAAAAGCCGCTC	ACTGGCTACAAAAGCCGCTC
<b>RPS23</b>	AGTGTGCGGGTCTTCGTACT	ATTTGGCTGTTTGGCTTCAA
<b>SUZ12</b>	GAACACCTATCACACACATTCTTGT	TAGAGGCGGTTGTGTCCACT

#### 2.3.4.3. Reverse Transkription

Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurde die M-MLV Reverse Transkriptase verwendet. Durch die Verwendung von Oligo(dT)-Primern wurde selektiv die mRNA-Fraktion aus der gewonnenen total-RNA in cDNA umgeschrieben. Die Transkription wurde nach Herstellerangaben (Tab.5) durchgeführt (*vgl. Herstellerangaben Anhang IX.3.2. S.181*).

**Tab.5: Reagenzien für die Durchführung der reversen Transkription**

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
Oligo (dT) <sub>15</sub> -Primer	1 µl	0,5 µg/µl
tRNA-Probe	1 µl	1 ng-1 µg
Zwischenvolumen	2 µl	
M-MLV RT 5x Puffer®	5 µl	1x
dNTP-Mix	1,25 µl	10 mM
RNasin	0,625 µl	2,5 u/µl
M-MLV RT®	1 µl	40 u/µl
H <sub>2</sub> O RNase free	15 µl	
Endvolumen	25 µl	

In einem ersten Schritt wurden der Primer und die Probe zusammen im Thermocycler auf 70°C erhitzt und anschließend im Reaktionsgefäß auf Eis gestellt. Währenddessen wurden die für den zweiten Ansatz benötigten Reagenzien nach dem Schema in Tab.5 zusammenpipettiert, gemischt und in das Reaktionsgefäß gegeben. Nach einem weiteren Inkubationsschritt über 10 min bei 40°C erfolgte die Transkription bei 48°C für 50 min. Die Inaktivierung der RT erfolgt bei 70°C.

Um die cDNA-Konzentration zu messen, wurde 1 µl der Probe in einem Mikrophotometer überführt. Durch das Verhältnis von DNA zur gemessenen Proteinkonzentration kann gleichzeitig die Reinheit der DNA überprüft werden. Anschließend wurde die Probe auf 200 ng/µl mit RNase freiem Wasser verdünnt.

#### 2.3.4.4. Quantitative Real Time PCR

Die qualitative Real Time PCR (qRT-PCR) ist eine Methode zur quantitativen Darstellung von PCR-Produkten in Echtzeit. Hierbei wird nach jedem qRT-PCR-Zyklus die Extinktion eines mit doppelsträngiger DNA (dsDNA) interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (z.B. SybGreen) ermittelt. Die Extinktion ist proportional zur Menge gebildeter DNA.

Eine dem qRT-PCR-Lauf nachfolgende Schmelzkurvenanalyse dient zur Produktcharakterisierung, da der Fluoreszenzfarbstoff unspezifisch mit dsDNA interkaliert (WILHELM & PINGOUD, 2003).

Für die qRT-PCR wurde mit einem vorgefertigten Mastermix gearbeitet. Der Mastermix und die Primer wurden an einem abgesonderten Arbeitsplatz zusammengefügt (Tab. 6).

**Tab. 6: Reagenzien für qRT-PCR**

Reagenzien	Volumen	Endkonzentration
2xSensieFast SYBR	5 µl	1x
10µM forward Primer	0,4 µl	400 nM
10µM reverse Primer	0,4 µl	400 nM
H <sub>2</sub> O RNase free	3,2 µl	
Probe	1 µl	200 ng/µl
Enddvolumen	10 µl	

Nach einem 3-Schritt-Protokoll wurde die Probe zuerst auf 95°C für 2 min erhitzt. Für die eigentliche qRT-PCR wurde die Probe in 40 Zyklen zur Denaturierung für

5 s auf 95°C, für das Annealing für 10 s auf 60°C und für die Extension für 5 s auf 72°C gebracht. Abschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die einzelnen qRT-PCR-Läufe wurden mit der Software TOptical analyze (Fa. Biometra) ausgewertet (vgl. *Geräte Anhang IX.3.1. S.179, Hersteller Anhang IX.3.2. S.181*).

### **3. Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurden die Software-Programme Excel (2007, Microsoft), STATCALC (CDC, Washington, USA, 1993) und SPSS (IBM, Version 19) verwendet. Für die Auswertung der qRT-PCR-Daten nach der Housekeeping-Gen-Methode wurde REST (Quiagen, 2009) verwendet und die Daten anschließend mit den oben genannten Programmen auf Unterschiede überprüft.

Daten wurden visuell auf Normalverteilung überprüft (anhand Boxplots). Bei nicht-normalverteilten Daten wurden nicht-parametrische Tests eingesetzt.

Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test, für den Vergleich von zwei Gruppen der Mann-Whitney-Test angewandt (BORTZ & SCHUSTER, 2010). Dabei wurde für paarweise Vergleiche die Bonferroni-Korrektur angewandt. Für die Auswertung der qRT-PCR-Ergebnisse wurde die Software REST 2009 (Quiagen) verwendet. Vorab wurde die Effizienz aus einer Verdünnungsreihe der cDNA aller Kontrollen des ersten Zeitpunktes in einem qRT-PCR-Lauf ermittelt.

Zur Auswertung der semiquantitativen histologischen Untersuchungen wurde der Chi-Quadrat Test in der Statistiksoftware STATCALC verwendet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Ergebnisse der histologischen Untersuchungen**

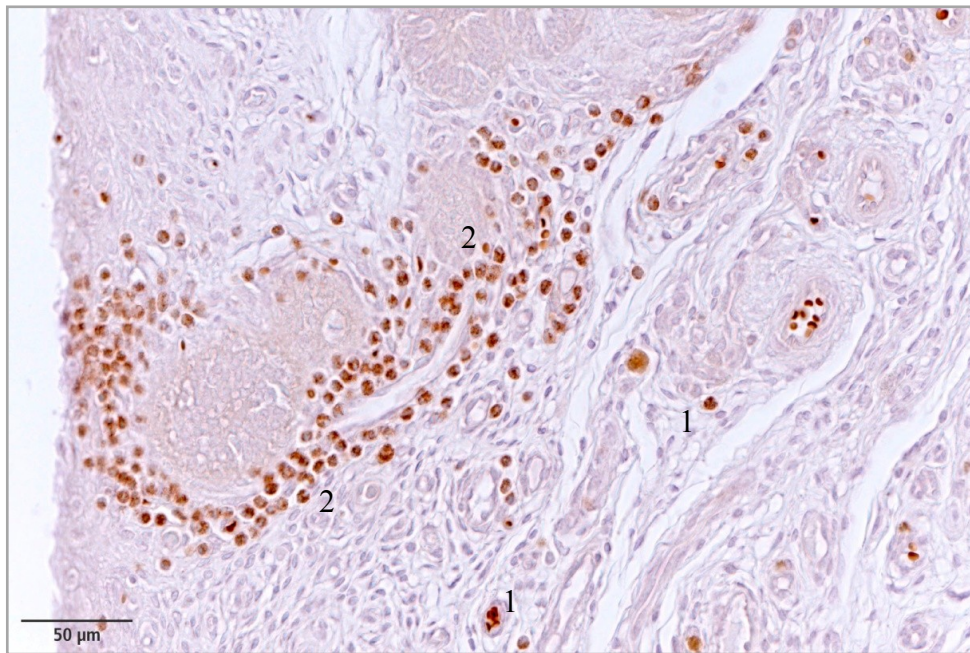
#### **1.1. Methodische Vorarbeiten**

In der vorliegenden Arbeit wurden Anstrengungen unternommen, um Makrophagen und Monozyten histologisch eindeutig darzustellen. Für den Nachweis von Makrophagen wurde enzymhistologisch die in den Lysosomen in großer Menge lokalisierte Peroxidase sowie saure Phosphatase genutzt. Zudem wurden für die immunhistologische Färbung zwei Antikörper getestet.

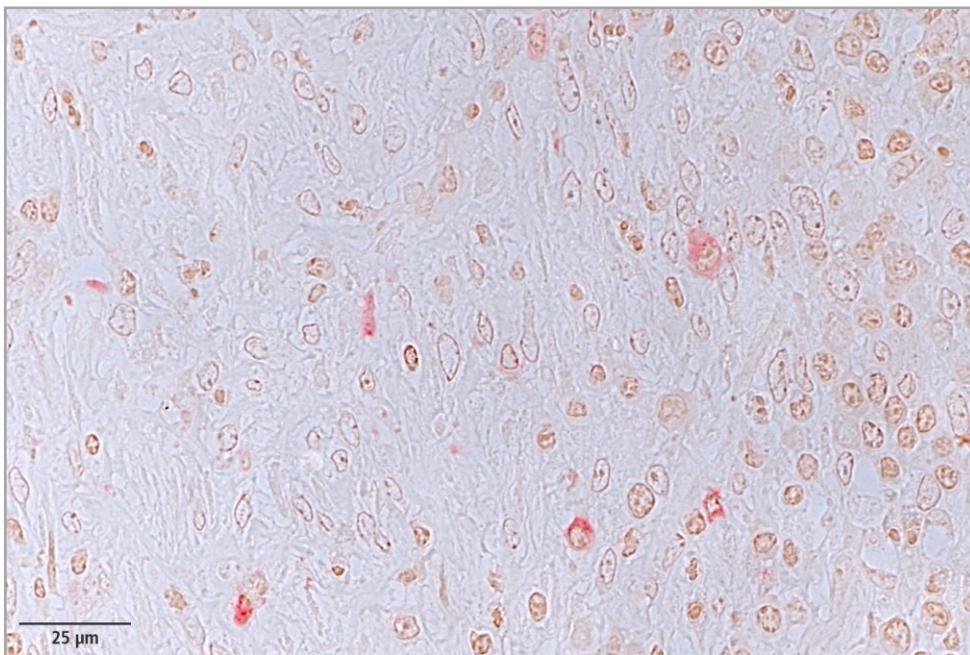
Die Umsetzung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zu einem bräunlich präzipitierenden Chromogen wird durch endogene Peroxidase katalysiert. Die Färbung war unter den durchgeführten Bedingungen am bovinen Endometrium zu unspezifisch. Es wurden neben Makrophagen auch eosinophile Granulozyten, Leukozyten und Erythrozyten angefärbt. Makrophagen konnten so nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abb.2, S.40). Die Färbung wurde nicht weiter angewandt.

Saure Phosphatasen setzen das Substrat Naphthol-AS-Bi-Phosphat zusammen mit Pararosanilin zu einem rot-bräunlichen Farbstoff um. Unter den durchgeführten Inkubationszeiten bis zu 48 h mit einem Wechsel des Substrats alle 8 h konnte jedoch kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, da die Färbung zu schwach und die Reproduzierbarkeit zu gering war.

Der gegen CD68 gerichtete Antikörper Clon SPM281 führte unter keiner der angewandten Methoden zur Demaskierung und Detektion zur eindeutigen positiven Markierung von Makrophagen. Hingegen markierte der gegen Calprotectin, ein intracytoplasmatisches Antigen in Makrophagen, Granulozyten und Monozyten, gerichtete Antikörper MAC387 neben den Makrophagen erwartungsgemäß auch PMN, sodass bei stark entzündeten Organen die Auswertung sehr schwierig wurde. Aufgrund der mangelnden Eignung des anti CD68 Antikörpers wurde MAC387 unter Berücksichtigung der eingeschränkten Aussage bei stark entzündeten Organen weiterhin zur Darstellung der Makrophagen verwendet.



**Abb.2: Endometrium einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Färbung der sauren Phosphatase, neben Makrophagen (1) sind hauptsächlich eosinophile Granulozyten (2) gefärbt. Zur eindeutigen Unterscheidung ist diese Färbung am Uterus des Rindes ungenügend**



**Abb.3: Endometrium einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, a-Naphtyl-Acetat Esterase (ANA)-Färbung, wenige Zellen sind nur undeutlich gefärbt**

Der Nachweis der Monozyten mittels der ANA Färbung ist für die Ratte und Katze etabliert. Trotz modifizierter Markierungsmethoden, die Inkubationszeiten wurden bis 48 h mit 8stündigen Substratwechsel ausgedehnt, gelang der Transfer auf bovines endometriales Gewebe nicht (Abb.3) Die Färbung wurde nicht weiter angewandt.



## 1.2. Untersuchungen an Uteri nicht tragender Färsen

### 1.2.1. Morphologie

Es wurden die Uteri von insgesamt 15 nicht tragenden Färsen untersucht. Bei der Schlachtung hatten sie ein Durchschnittsalter von 33 Monaten. Die Gewebeproben der Färsen sollen insbesondere der Erhebung des histologischen Normalstatus dienen. Von jedem Uterus wurden insgesamt 14 Proben untersucht, die sich über die gesamte Länge sowie die dorsalen und ventralen Anteile des Organs erstrecken. Ziel ist es dabei, eine semiquantitative Aussage über mögliche Verteilungsunterschiede der einzelnen Komponenten innerhalb des Uterus zu treffen. Alle untersuchten Tiere befanden sich in der Gelbkörperphase, ein Einfluss des Zyklusstadiums kann deshalb weitgehend ausgeschlossen werden.

Der Uterus besteht aus den drei Hauptanteilen Endometrium, Myometrium und Perimetrium (Abb. 4).

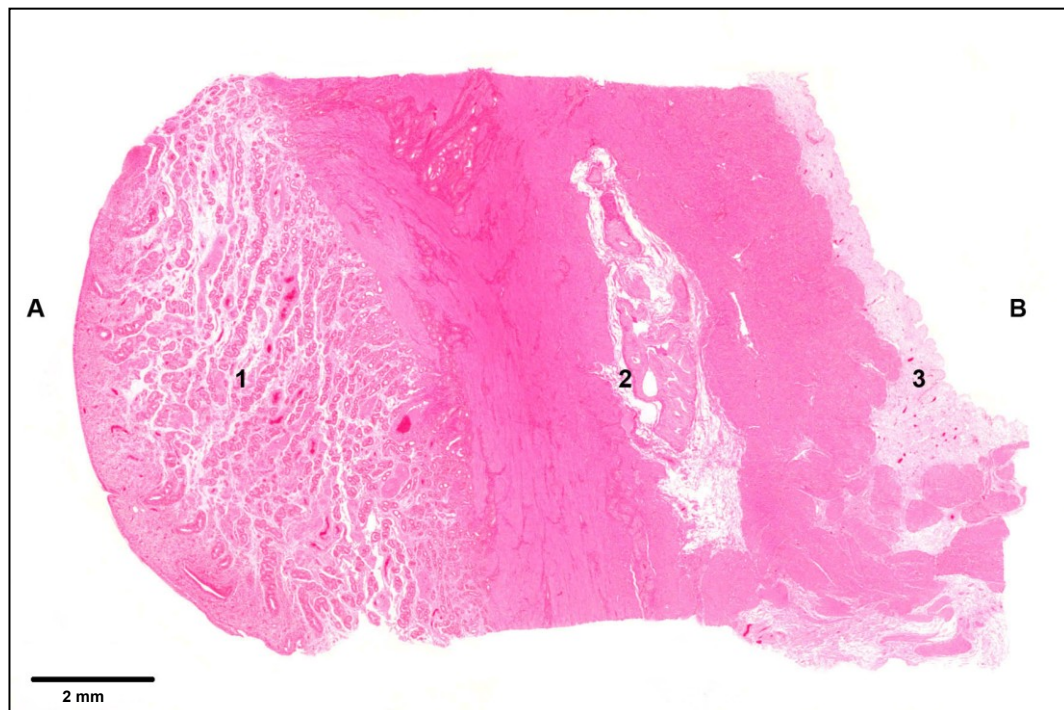
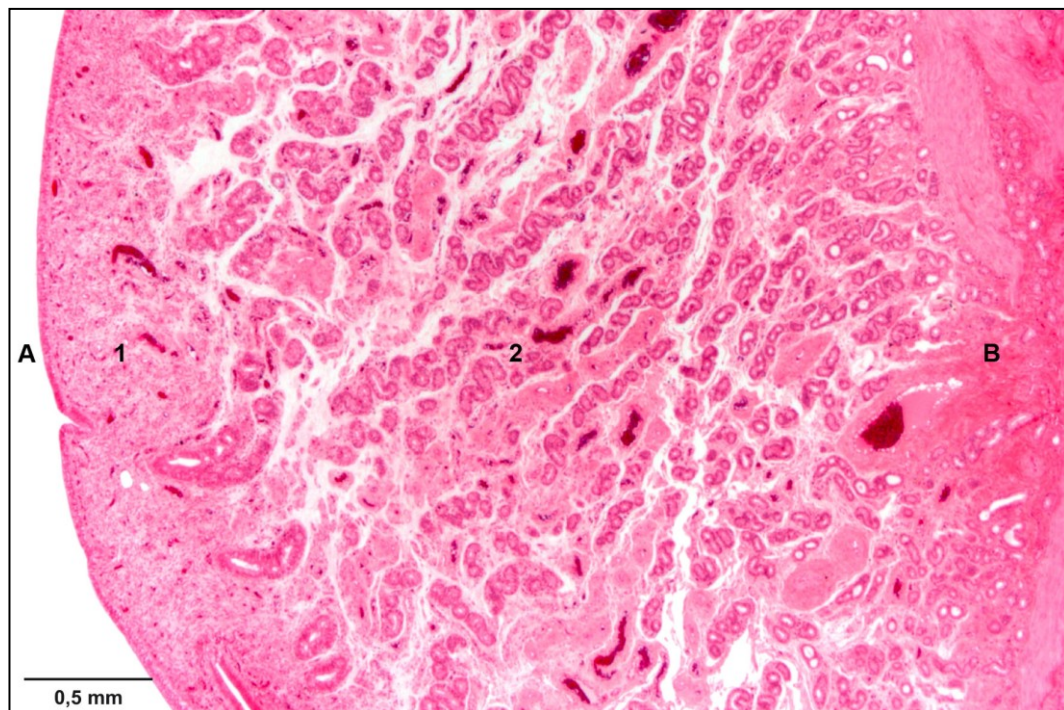


Abb. 4: Uterus einer nicht tragenden Färse in der Übersicht. 1: Endometrium; 2 Myometrium; 3: Perimetrium; A: Uteruslumen; B: Beckenhöhle; HE-Färbung, Kunststoff

Das Endometrium weist einen epithelialen und einen mesenchymalen Anteil auf. Der epitheliale Anteil besteht aus dem Oberflächenepithel und den Uterindrüsen. Das Oberflächenepithel ist ein kubisches bis hochprismatisches, überwiegend einschichtiges Epithel und die Uterindrüsen sind tubuläre, verzweigte Drüsen.

Der mesenchymale Anteil des Endometriums (*Propria mucosae*) setzt sich aus dem ortständigen Bindegewebe und aus freien Zellen zusammen. Die unterschiedliche Dichte des (Binde-)Gewebes erlaubt die Unterscheidung eines lumennahe gelegenen dichten *Str. compactum* und eines myometriumnahe gelegenen lockeren *Str. spongiosum* (Abb. 5). Im *Str. compactum* findet man die vereinzelt liegenden Anschnitte der Mündungsanteile der Uterindrüsen, im *Str. spongiosum* hingegen die zahlreichen Anschnitte der verzweigten tiefen Anteile der Uterindrüsen sowie größere Blutgefäße.



**Abb. 5:** Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über das Endometrium, 1: *Str. compactum*; 2: *Str. spongiosum*; A: Uteruslumen; B: Myometrium; HE-Färbung

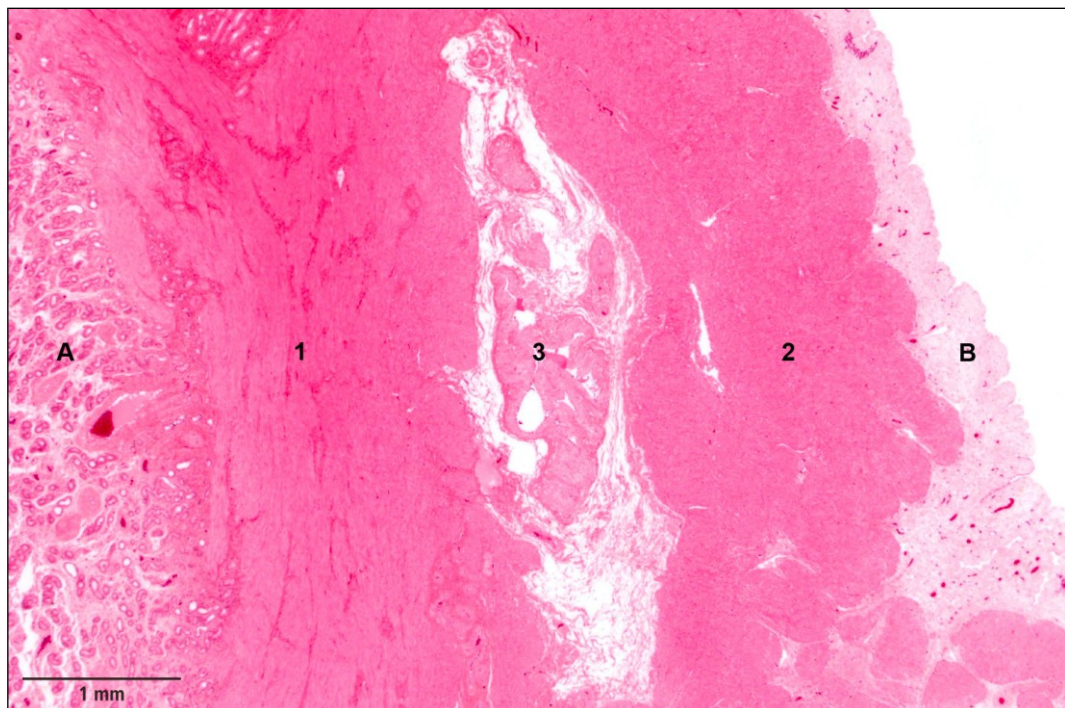
In das Endometrium eingelagert sind die Karunkelanlagen, in denen das Gewebe dichter, gefäßreicher und drüsenfrei ist (Abb.6, S.43).





**Abb.6: Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über eine Karunkelanlage, 1: Karunkelanlage; 2: Endometrium; A: Uteruslumen; HE-Färbung**

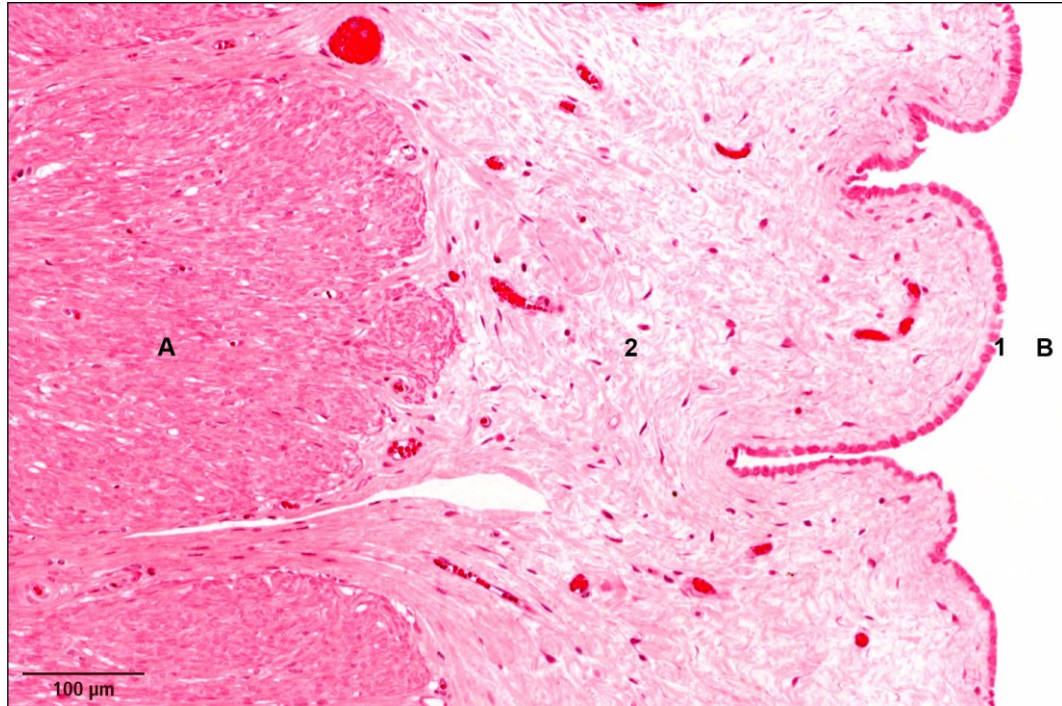
Das Myometrium setzt sich aus einer inneren, dickeren zirkulären und einer äußeren, dünneren longitudinalen Muskelschicht zusammen. Zwischen den beiden Muskelschichten ist ein unterschiedlich breites *Str. vasculosum* eingeschaltet (Abb. 7), das große Gefäße in einem lockeren Bindegewebe führt.



**Abb. 7: Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über das Myometrium, 1: innere zirkuläre Muskelschicht; 2: äußere longitudinale Muskelschicht; 3: Str. vasculosum; A: Endometrium; B: Perimetrium; HE-Färbung**

Im lockeren Bindegewebe finden sich außerdem unterschiedliche Mengen an freien Zellen.

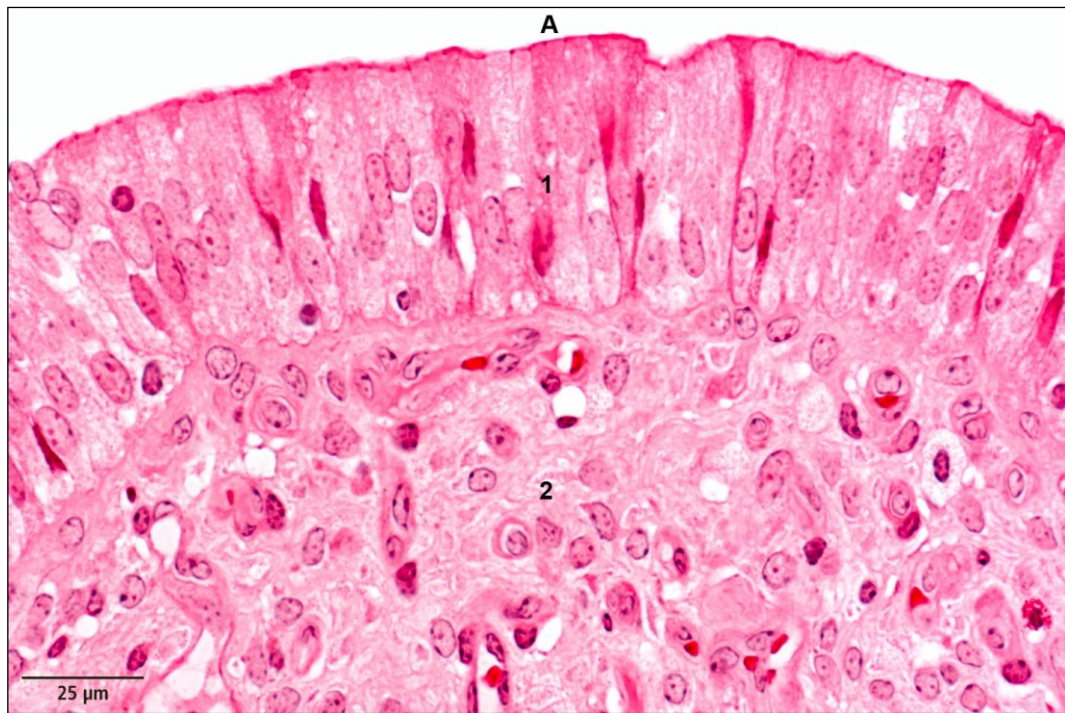
Das Perimetrium besteht aus der äußeren einschichtigen *Tunica serosa*, die unterlagert wird vom lockeren Bindegewebe der *Tela subserosa* (Abb. 8).



**Abb. 8: Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über das Perimetrium, 1: Tunica serosa; 2: Tela subserosa, A: Myometrium, B: Beckenhöhle, HE-Färbung**

Das Oberflächenepithel des Endometriums ist ein mehrreihiges, hochprismatisches Epithel (Abb.9, S.45). Die locker strukturierten, länglichen Zellkerne liegen in der unteren Zellhälfte. Zilien konnten nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Eine eindeutige Basalmembran ist im HE-Präparat nicht zu erkennen.

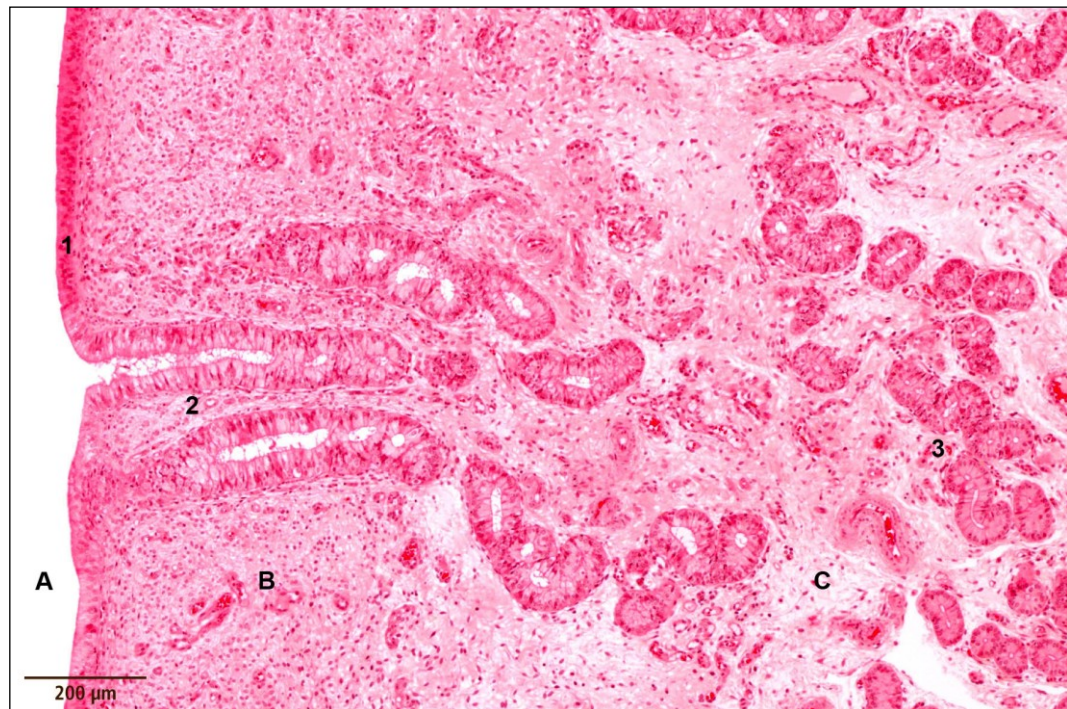




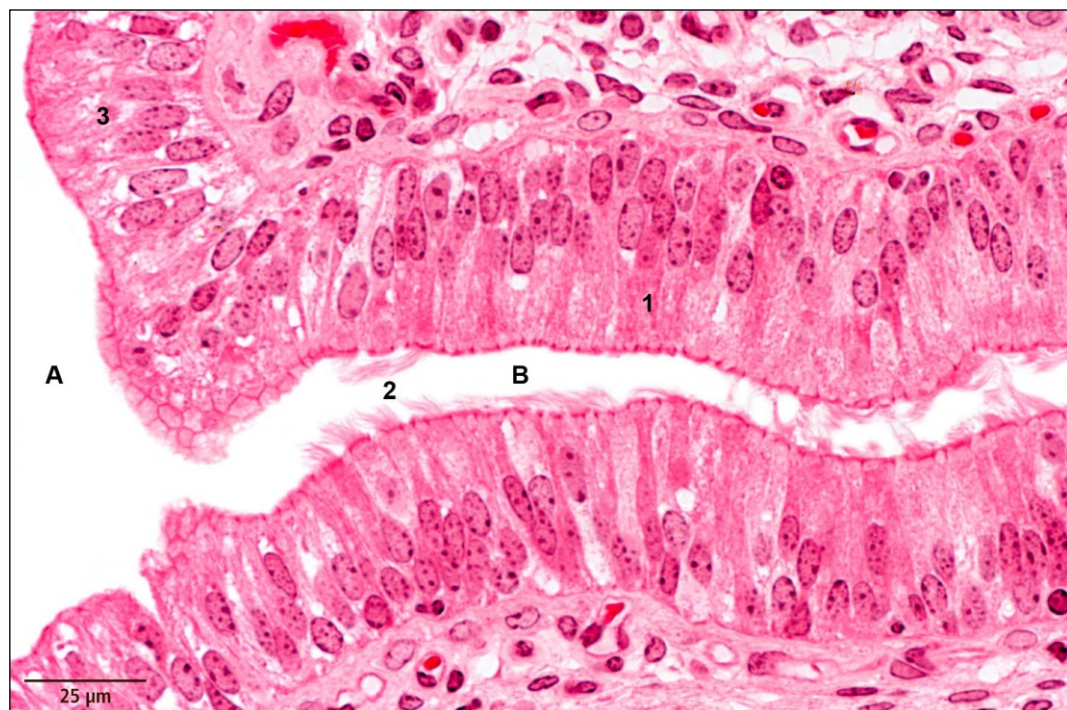
**Abb.9: Uterus einer nicht tragenden Färs, 1: mehrreihiges, hochprismatisches Oberflächenepithel, es ruht auf dem Bindegewebe des Str. compactum (2); A Uteruslumen, HE-Färbung**

Die Uterindrüsen weisen in ihrem proximalen, lumennahen, im *Str. compactum* verlaufenden Anteil einen größeren Durchmesser auf als in den distalen, tieferen Anteilen (Abb.10, S.46). Der größere Durchmesser beruht auf einer größeren Höhe der Zellen und auf einem weiteren Lumen.

Das Epithel der gestreckt verlaufenden proximalen Drüsenanteile entspricht dem Oberflächenepithel, teilweise tragen die Zellen hingegen Zilien (Abb.11, S.46).



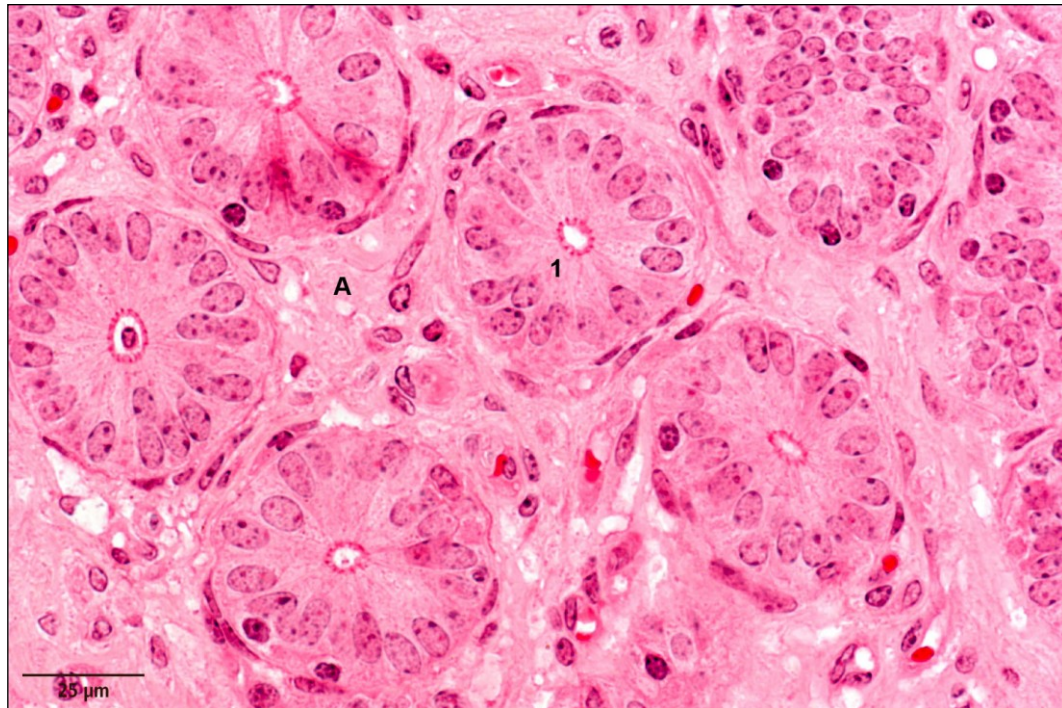
**Abb.10: Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über die Uterindrüsen; 1: Oberflächenepithel; 2: proximale, oberflächliche Drüsenanteile; 3: distale, tiefe Drüsenanteile; A: Uteruslumen; B: Str. compactum; C: Str. spongiosum; HE-Färbung**



**Abb.11: Uterus einer nicht tragenden Färs, proximaler Anteil einer Uterindrüse; 1: Drüsenepithel; 2: einzelne Zellen tragen Zilien; 3: Oberflächenepithel; A: Uteruslumen; B: Drüsenlumen; HE-Färbung**



Die distalen Drüsenanschnitte sind wesentlich zahlreicher als die proximalen, sie liegen dicht nebeneinander, sind häufig quer angeschnitten, teils finden sich aber auch gewundene Drüsenschläuche; Verzweigungen der Drüsen sind sehr selten zu finden (Abb.12, S.47). Ein eindeutiges Drüsensekret ist nicht zu erkennen.



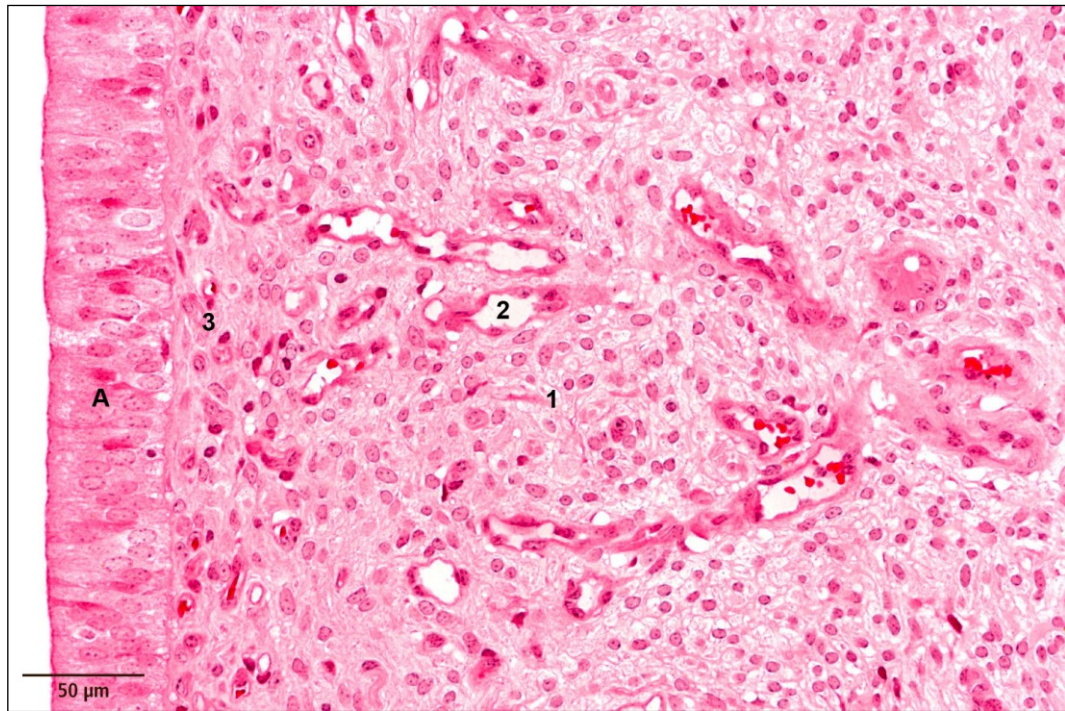
**Abb.12: Uterus einer nicht tragenden Färs, distale Anteile von Uterindrüsen; 1: Drüsene epithel; A: Stroma im Str. spongiosum; HE-Färbung**

Das Stroma im *Str. compactum* ist zellreich und kollagenfaserarm; die Zellen bilden einen nahezu kohärenten Zellverband (Abb.13, S.48). Der Eindruck einer kompakten Zelllage kommt durch den Reichtum an ortsständigen Zellen und weniger durch eingewanderte freie Zellen zustande. Die Zellkerne der Stromazellen sind rundlich und aufgelockert; sie verfügen über relativ wenig Zytoplasma. Zellausläufer und Zellgrenzen sind nicht zu erkennen. Die älteren Interpretationen dieses Zellverbandes als retikuläres oder spinozelluläres Bindegewebe erscheinen unzutreffend. Das *Str. compactum* ist reich an kleinen Blutgefäßen und Kapillaren (Abb.13).

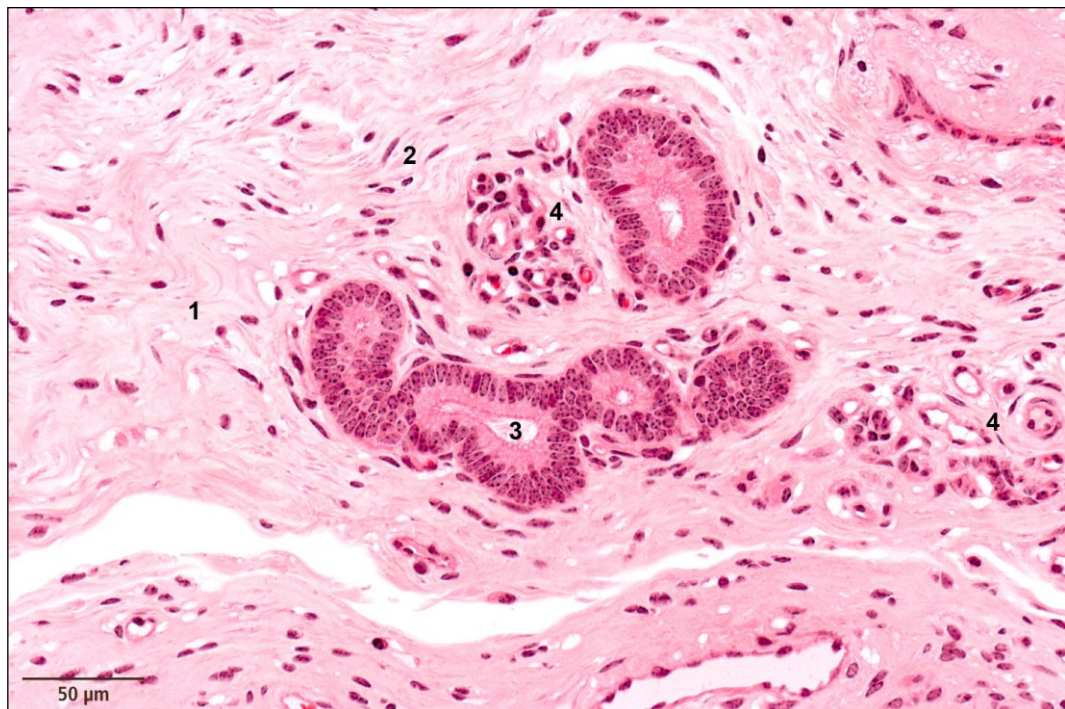
Das Stroma im *Str. spongiosum* kann unterschiedliche Formen annehmen. Grundform ist ein kollagenfaserreiches und zellarmes Bindegewebe (

Abb.14, S.48). Die Zellkerne der Stromazellen sind hier spindelförmig und heterochromatinreich. Neben den Anschnitten der distalen Drüsenanteile finden sich Blutgefäße unterschiedlichen Kalibers und Wandstärke.





**Abb.13: Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über das 1: Str. compactum; 2: kleine Blutgefäße; 3: Kapillaren, die bis dicht unter das Oberflächenepithel (A) reichen**

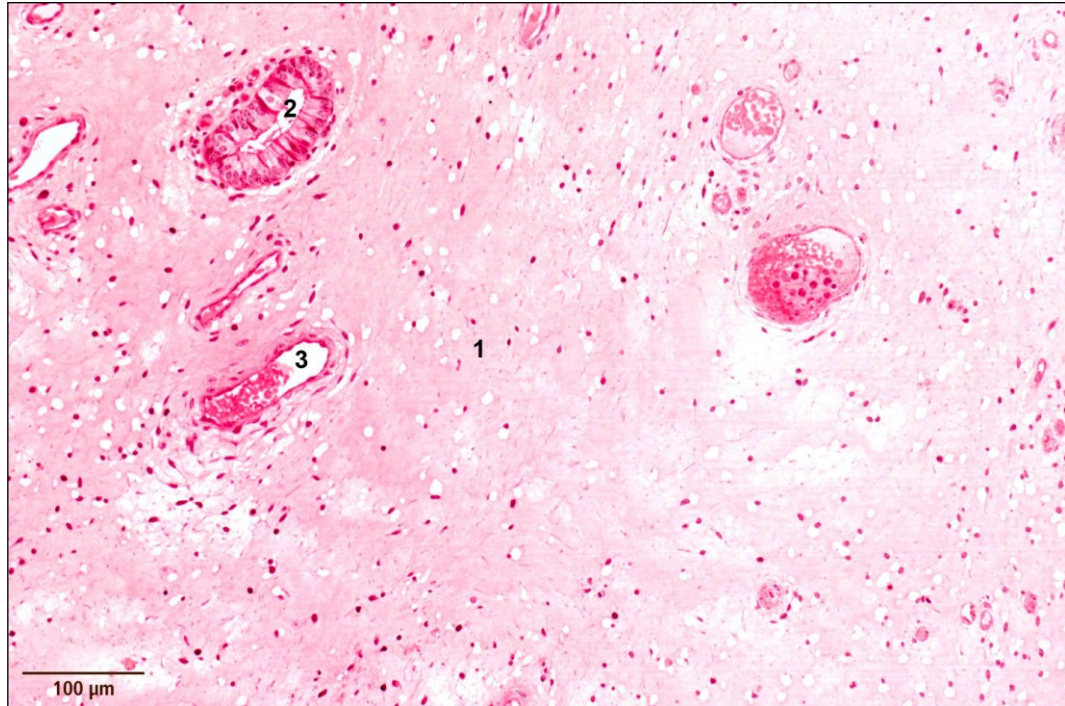


**Abb.14: Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über das Str. spongiosum; 1: Kollagenfasern; 2: spindelförmige, chromatinreiche Zellkerne von Stromazellen; 3: distale Anteile von Uterindrüsen; 4: Ansammlungen kleinkalibriger Blutgefäße; HE-Färbung**

Abweichend von dieser Grundform kann man zwei Veränderungen finden, die dem *Str. spongiosum* ein schwammähnliches Aussehen verleihen und die Namensgebung dieses Areals erklären können. Bei einzelnen nicht tragenden Färsen ist eine hochgradige Ödematisierung des *Str. spongiosum* zu beobachten



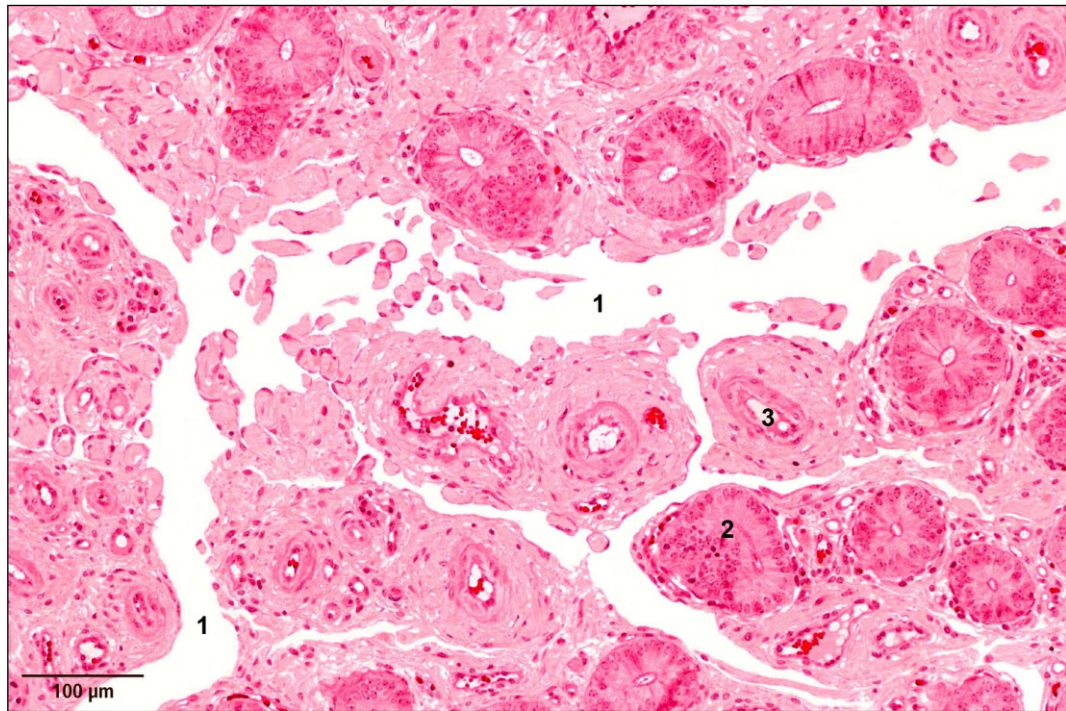
(Abb.15). Stromazellen, Drüsenanschnitte und Gefäße sind durch eine unterschiedlich eiweißreiche (eosinophile) Ödemflüssigkeit weit auseinandergedrängt.



**Abb.15: Uterus einer nicht tragenden Färs mit hochgradigem Ödem im Str. spongiosum; 1: eiweißreiche Ödemflüssigkeit mit hochgradig aufgelockertem Stroma; 2: Drüsenanschnitt; 3: Blutgefäß; HE-Färbung**

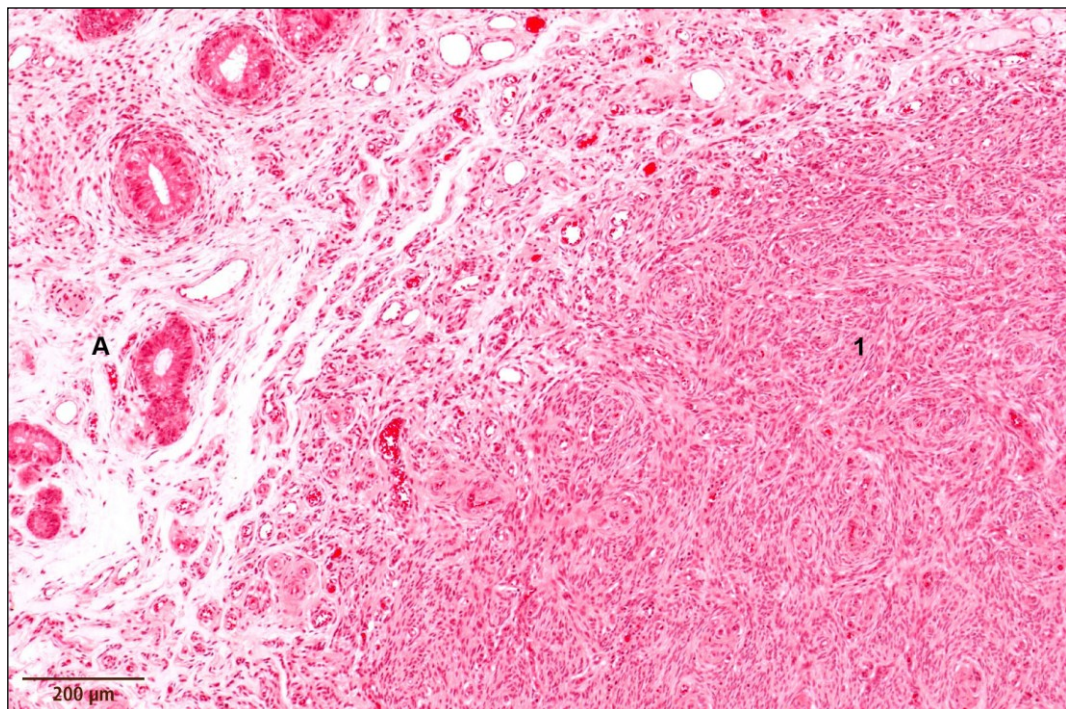
Bei anderen Färsen ist das *Str. spongiosum* von zahlreichen weitleumigen Lymphkapillaren durchzogen (Abb.16, S.50). Größere Blutgefäße und Drüsen sind von einem dichten Bindegewebe umgeben und liegen wie Inseln zwischen den Lymphkapillaren.





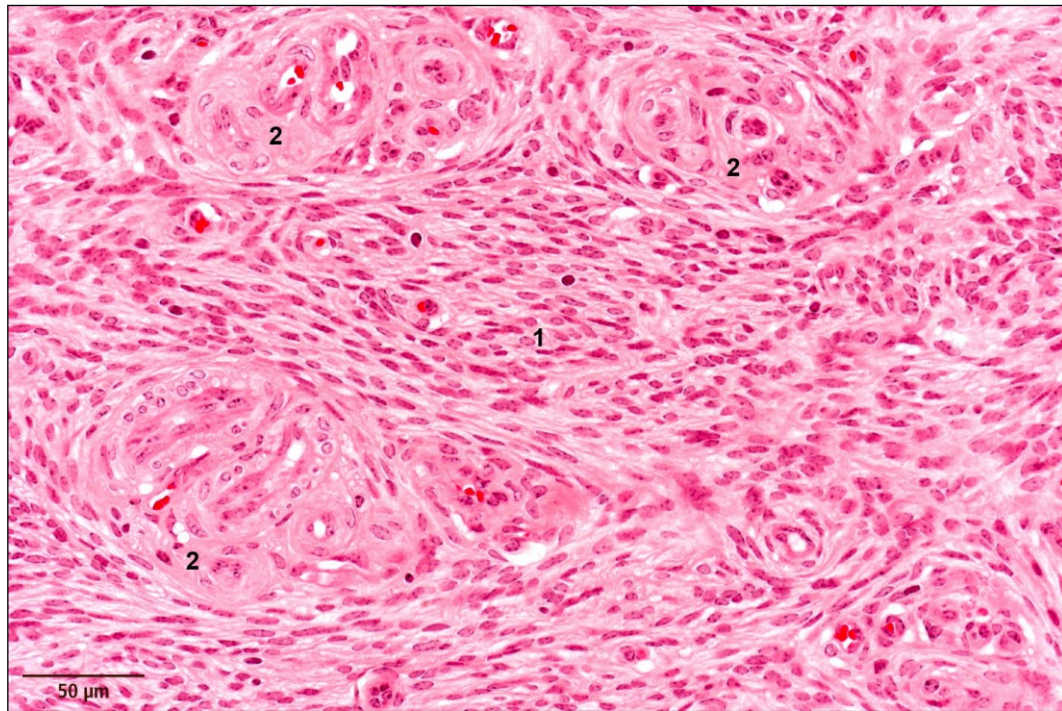
**Abb.16: Uterus einer nicht tragenden Färs, verzweigtes Netz von weitlumigen, anastomosierenden Lymphkapillaren im Str. spongiosum (1); 2: Drüsenanschnitt; 3: Gefäß; HE-Färbung**

Die Karunkelanlagen weisen das dichteste Stroma des Endometriums auf (Abb.17). In ein spinozelluläres Bindegewebe (fischzugähnlich angeordnete spindelförmige Fibrozyten mit wenig extrazellulärer Matrix) sind zahlreiche Bündel von Blutgefäßen unterschiedlichen Kalibers eingelagert (Abb.18, S.51).



**Abb.17: Uterus einer nicht tragenden Färs, Übersicht über eine Karunkelanlage (1), A: Str. spongiosum; HE-Färbung**

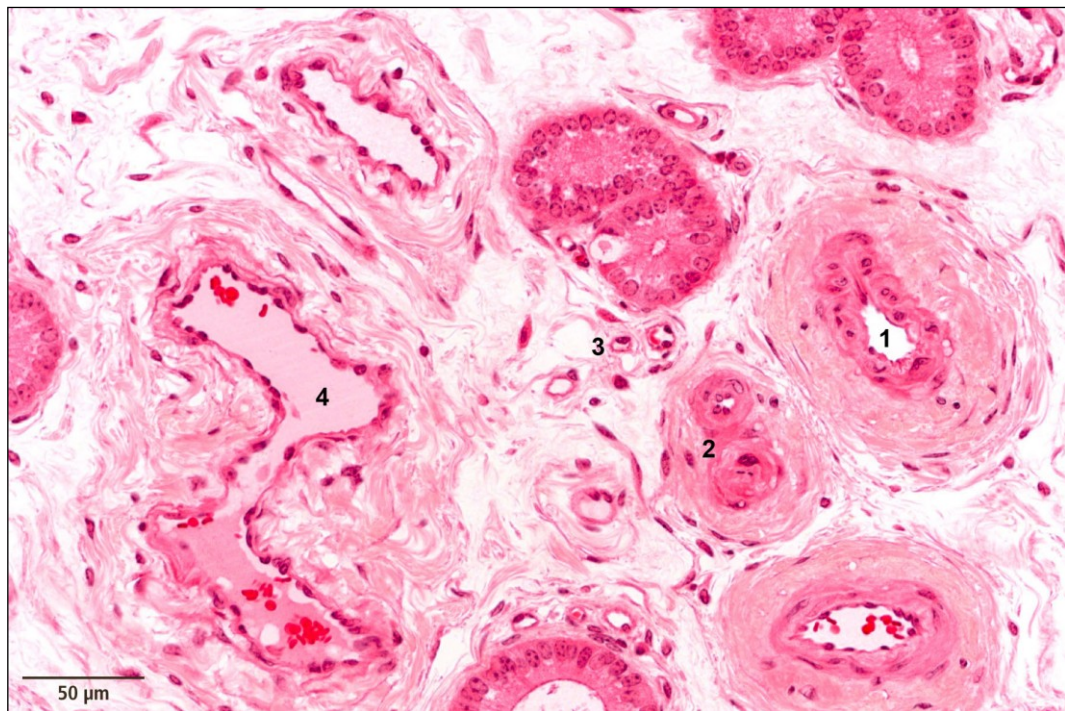




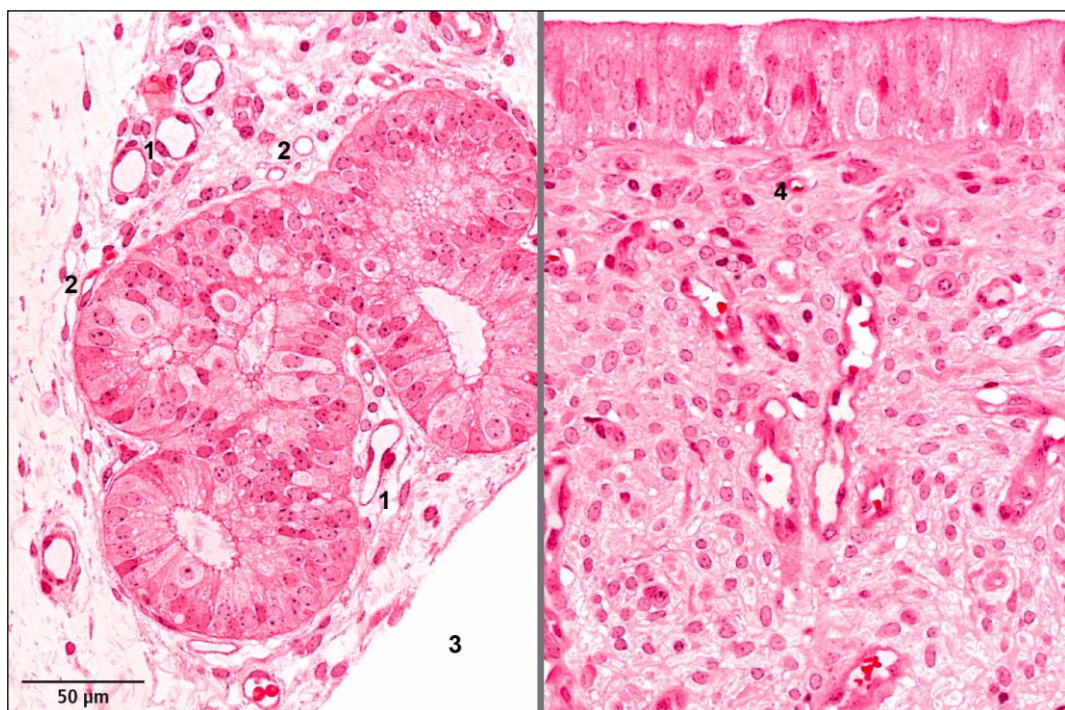
**Abb.18: Uterus einer nicht tragenden Färs, Karunkelanlage; 1: Stroma aus einem dichten, spinozellulären Bindegewebe; 2: Bündel von Gefäßen in einem lockeren Bindegewebe; HE-Färbung**

Die Blutgefäße im Endometrium lassen eine bevorzugte Verteilung nach ihrem Durchmesser erkennen. Im *Str. spongiosum* dominieren dickwandige Arterien und großlumige Venen (Abb.19, S.52). Beide Gefäßarten sind meist umgeben von einer Manschette aus zirkulär angeordnetem Bindegewebe (Adventitia). Die ebenfalls hier vorhandenen kleinkalibrigen Gefäße treten vergleichsweise weniger in Erscheinung. Periglandulär und im *Str. compactum* hingegen findet man überwiegend Arteriolen, Venolen und Kapillaren mit einem unterschiedlichen Durchmesser (Abb.20, S.52). Vereinzelt trifft man herdförmige dichte Ansammlungen von Kapillaren im *Str. spongiosum* an, deren Funktion nicht zu erkennen ist (Abb.21, S.53). Die Lymphkapillaren, die bei den untersuchten Färsen in unterschiedlichem Ausmaß in Erscheinung treten, sind weitlumige, verzweigte Spalträume im *Str. spongiosum* (Abb.22, S.53). Ausgekleidet werden sie von einem Endothel, weitere Wandschichten sind lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. In das Lumen ragen häufig dünne endothelbekleidete Bindegewebssepten, die diesen Gefäßen ein labyrinthähnliches Aussehen verleihen.



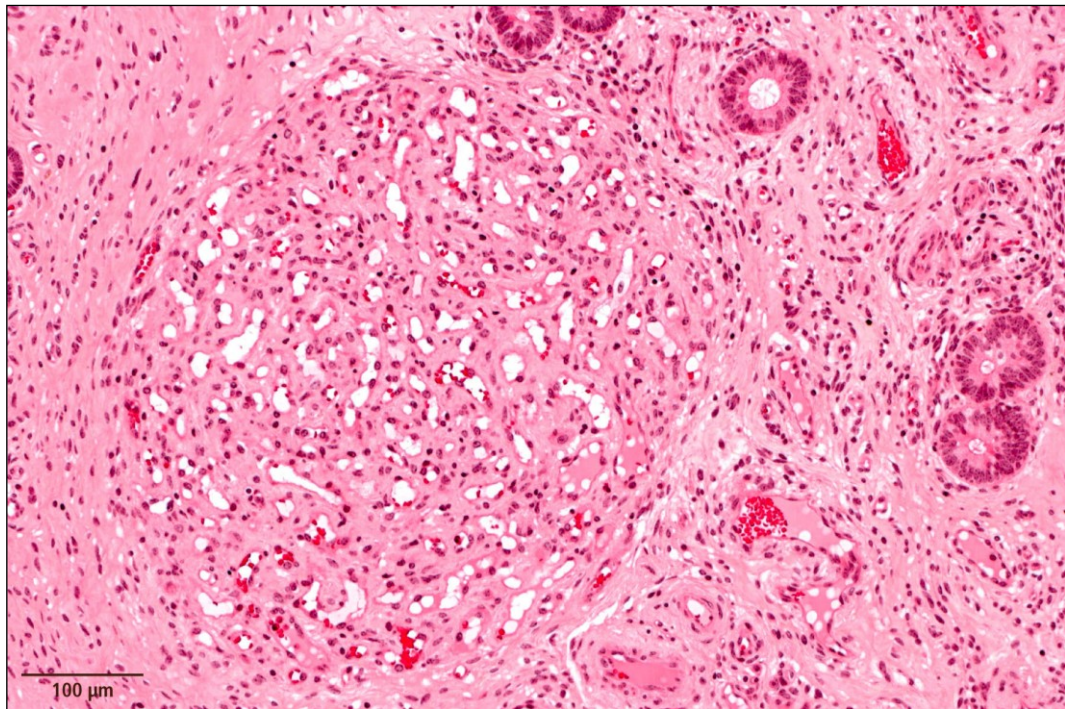


**Abb.19:** Uterus einer nicht tragenden Färs, Blutgefäße im Str. spongiosum, die Gefäße unterschiedlichen Kalibers sind von einer zirkulären Manschette von dichtem Bindegewebe umgeben; 1: Arterie; 2: Arteriole; 3: Kapillaren; 4: Vene; HE-Färbung

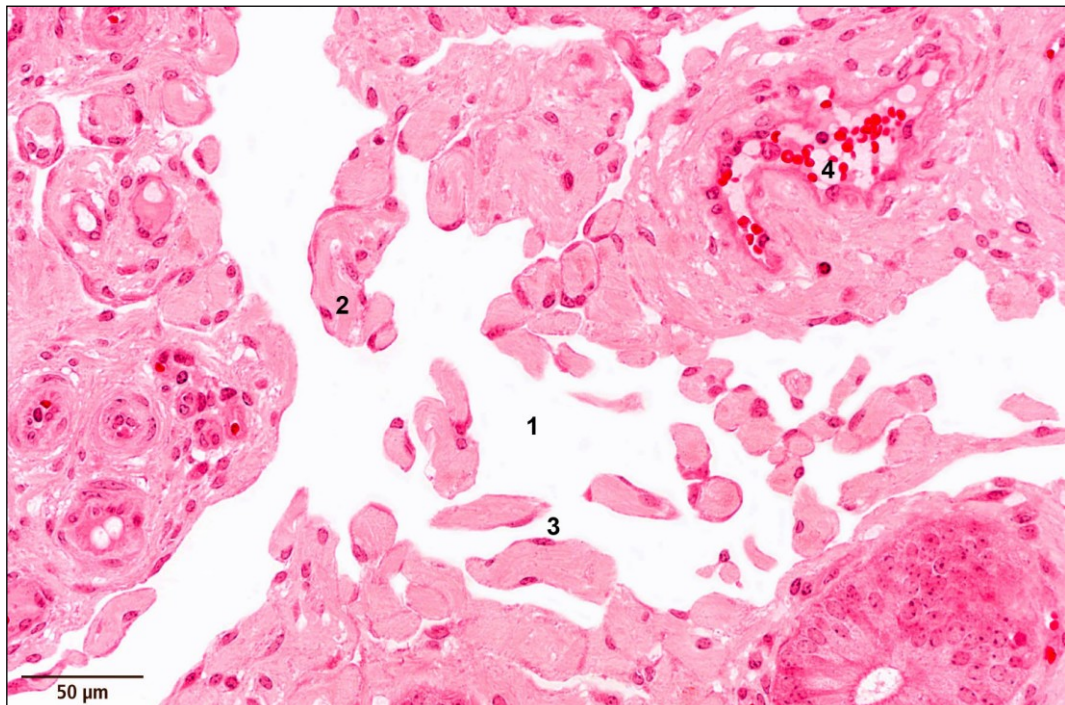


**Abb.20:** Uterus einer nicht tragenden Färs, kleinlumige Blutgefäße in der Nachbarschaft von Drüsen sowie subepithelial; 1: größere Kapillaren; 2 und 4: kleine Kapillaren; 3: Lymphkapillare; HE-Färbung



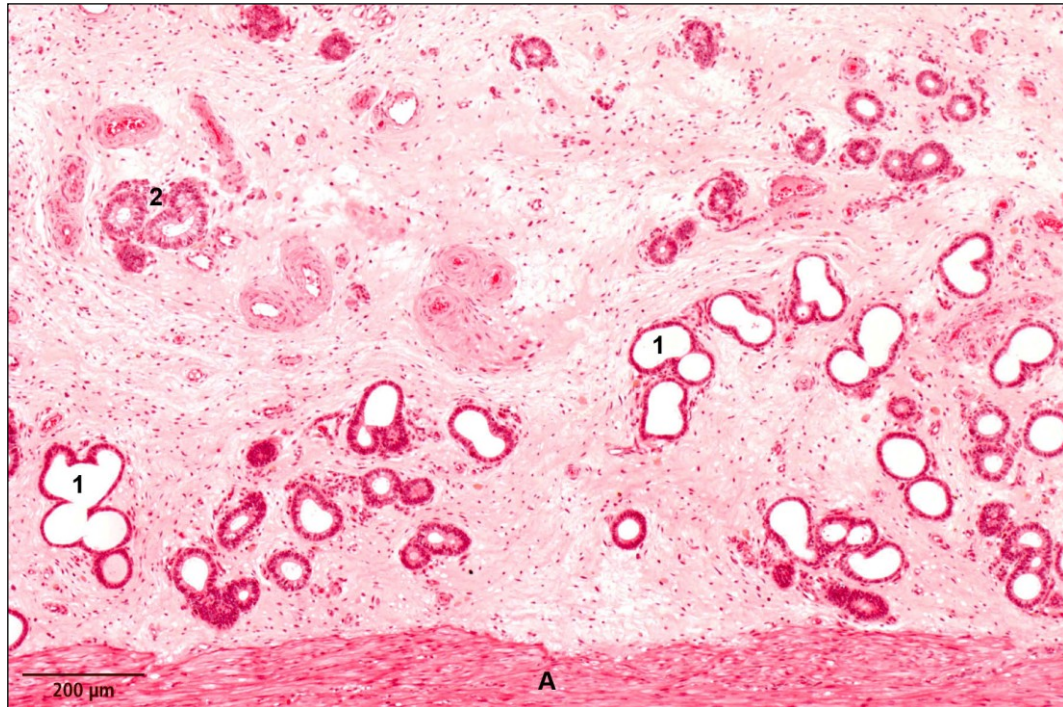


**Abb.21: Uterus einer nicht tragenden Färs, herdförmige Ansammlung von Kapillaren im Str. spongiosum; HE-Färbung**



**Abb.22: Uterus einer nicht tragenden Färs, Lymphkapillare im Str. spongiosum (1); 2: durchzogen von dünnen bindegewebigen Septen; 3: Kapillarendothel; 4: Blutgefäß; HE-Färbung**

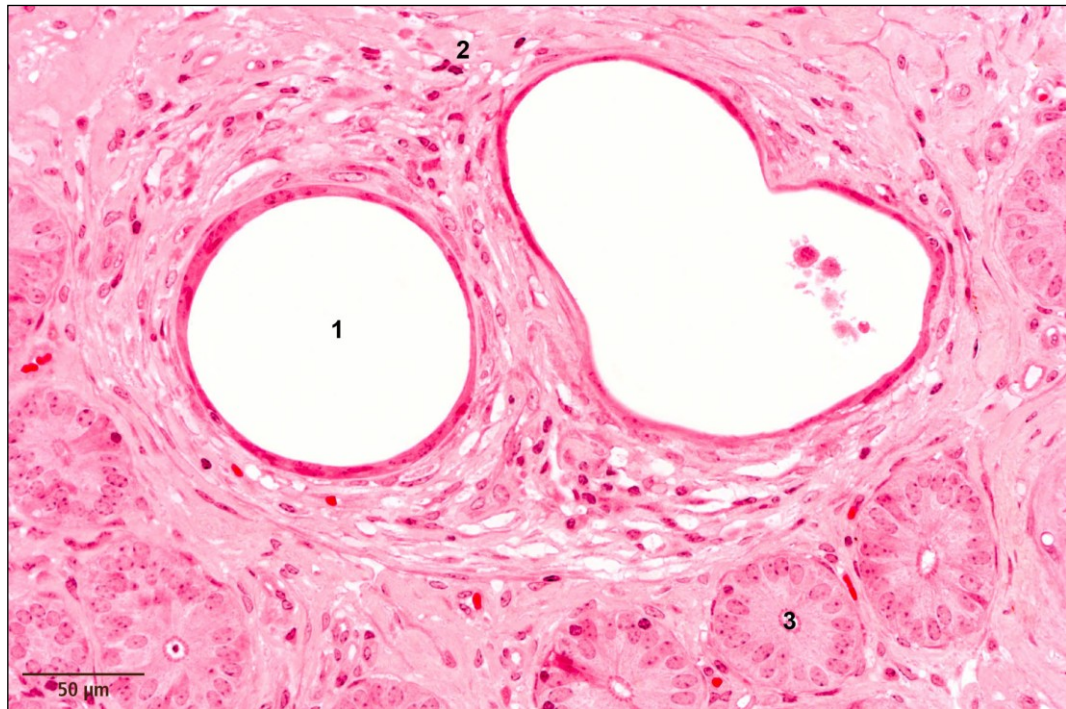
Bei einzelnen nicht tragenden Färsen lagen Befunde im Endometrium vor, die als pathologische Veränderungen interpretiert werden. Diese Veränderungen betreffen die Uterindrüsen (und vereinzelt größere Arterien im *Str. spongiosum*). Die Uterindrüsen zeigen eine herdförmige, unterschiedlich viele Anschnitte betreffende Dilatation der distalen Anteile (Abb.23).



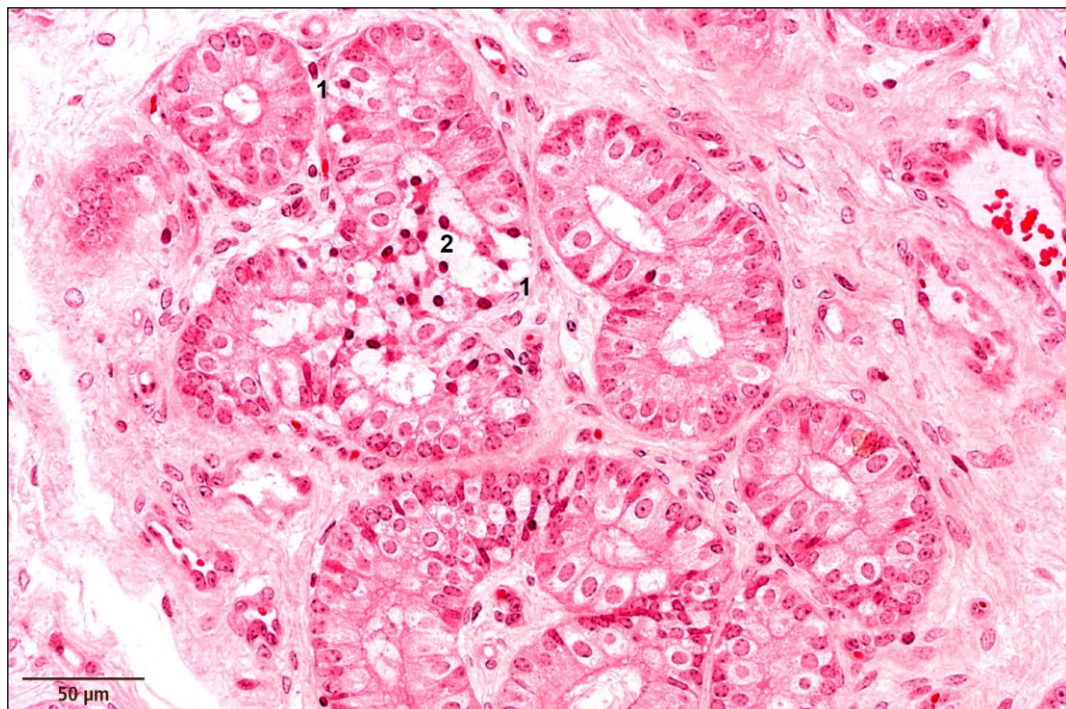
**Abb.23: Uterus einer nicht tragenden Färs, dilatierte Uterindrüsen (1) im Str. spongiosum; 2: normale Drüsenanschnitte; A: Myometrium; HE-Färbung**

Diese Drüsen sind in ihrem Durchmesser vergrößert, vor allem aber ist die Höhe der Drüsenepithelzellen hochgradig reduziert, ein Bild wie es typischerweise im Rahmen der Regeneration untergegangener Epithelzellverbände auftritt (Abb.24, S.55). Um die Drüsen herum findet man ein lockeres Bindegewebe mit einzelnen Entzündungszellen. Sehr vereinzelt kommt es zum Untergang von einzelnen oder wenigen Drüsenepithelzellen in den distalen Anteilen der Uterindrüsen unter Beteiligung von Lymphozyten (Abb.25, S.55)





**Abb.24:** Uterus einer nicht tragenden Färs, dilatierte Uterindrüsen (1) ausgekleidet mit lang gestreckten, schmalen Epithelzellen; 2: einzelne Entzündungszellen in einem lockeren periglandulären Bindegewebe; 3: normaler Drüsenanschnitt; HE-Färbung



**Abb.25:** Uterus einer nicht tragenden Färs, Untergang von Drüsenepithelzellen (1) und Infiltration durch Lymphozyten (2); HE-Färbung

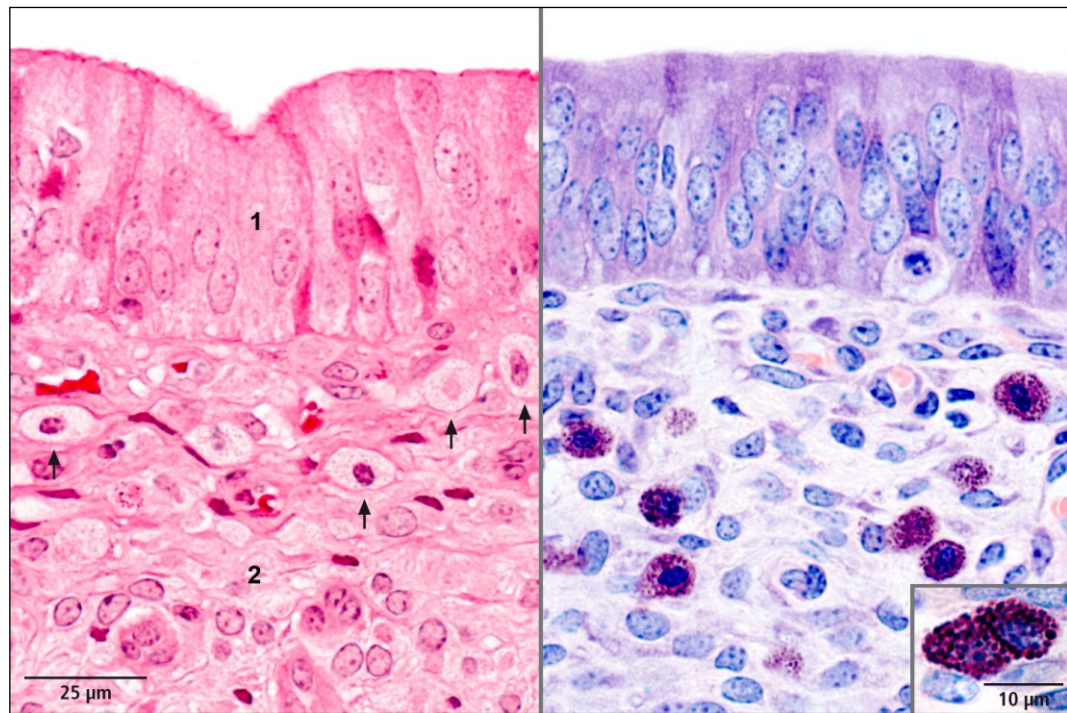
### **1.2.2. Freie Zellen im Endometrium**

Als freie Zellen im Endometrium treten auf: Mastzellen, Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten. Diese einzelnen Zellarten sollen im Folgenden in ihrer Verteilung und Vorkommenshäufigkeit beschrieben werden; dabei werden auch die jeweils verwendeten histochemischen, enzymhistochemischen oder immunhistochemischen Verfahren zum möglichst gezielten Nachweis der einzelnen Populationen beschrieben.

#### **1.2.2.1. Mastzellen**

Ihre Darstellung gelingt im HE-gefärbten Präparat nur unvollständig. Die großen Zellen weisen ein umfangreiches, sehr helles Zytoplasma auf, in dem undeutlich, schwach eosinophile Granula zu erkennen sind; der rundliche Zellkern liegt zentral (Abb.26 links, S.57). Sicher gelingt die Erfassung der Mastzellen durch die metachromatische Anfärbung ihrer Granula mittels Methylenblau, z.B. in der Färbung nach Giemsa. Die Anzahl der Granula ist unterschiedlich; zumeist ist das Zytoplasma hochgradig angefüllt, sodass der Zellkern gelegentlich überdeckt wird (Abb.26 rechts, S.57). Zellen mit wenigen oder nur vereinzelt Granula kommen vor. Sie scheinen teilweise degranuliert. Eine Darstellung der Mastzellen mittels des enzymhistochemischen Nachweises der Chlorazetat-Esterase, vermutlich einer Elastase (siehe neutrophile Granulozyten, PMN), die bei zahlreichen Tierarten neben den PMN auch in Mastzellen eine hochgradige Reaktion aufweist, gelingt im Uterus des Rindes nicht.

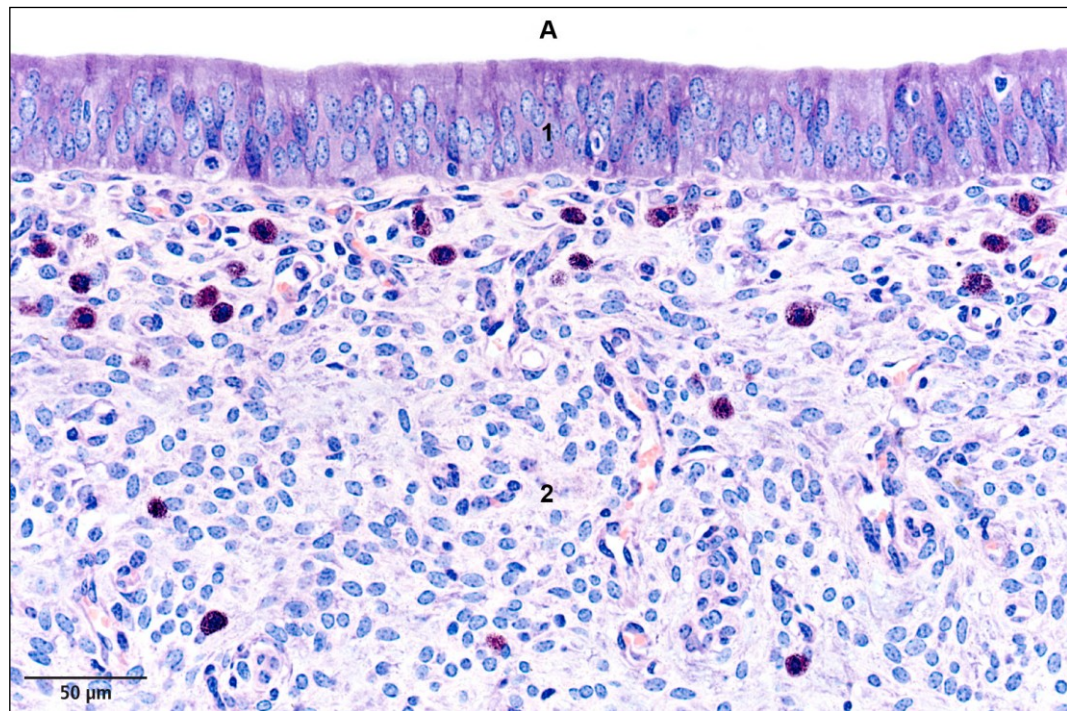




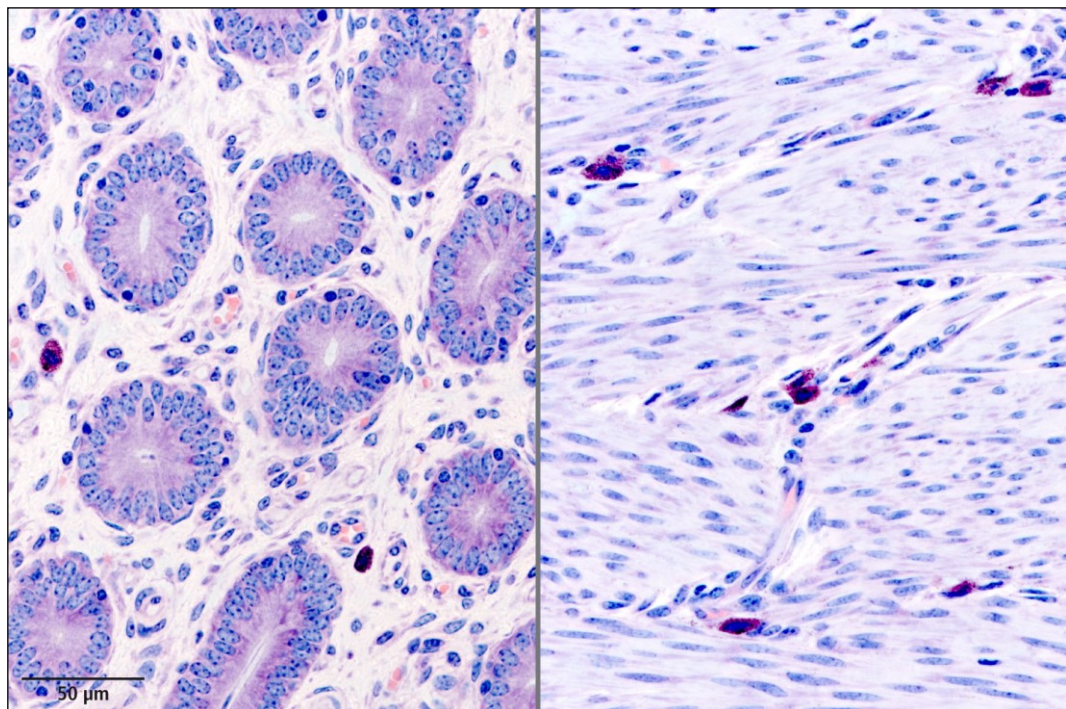
**Abb.26: Uterus einer nicht tragenden Färs, Darstellung der Mastzellen in der HE-Färbung (links) und der Färbung nach Giemsa (rechts); in der HE-Färbung sind die Zellen nur undeutlich zu erkennen (Pfeile), in der Giemsa-Färbung sind die Zellen durch ihre metachromatischen Granula gekennzeichnet; 1: Oberflächenepithel; 2: Str. compactum; Inset: Ausschnittvergrößerung**

Das Vorkommen von Mastzellen erstreckt sich in unterschiedlicher Anzahl über alle Schichten des Uterus. Regelmäßig in größerer Anzahl lassen sich Mastzellen als subepitheliales Band im oberen *Str. compactum* darstellen (Abb.27, S.58). Locker eingestreut sind sie im tieferen *Str. compactum* und im *Str. spongiosum*. Im Myometrium findet man ebenfalls zahlreiche Mastzellen, sowohl im lockeren Bindegewebe des *Str. vasculosum* als auch in Form einzelner Zellen perivaskulär zwischen den glatten Muskelzellen (Abb.28, S.58). Ebenfalls locker verteilt treten Mastzellen in der *Tela subserosa* auf.

Mastzellen sind die am regelmäßigsten in größerer Menge vorhandenen freien Zellen im Uterus der Färsen.



**Abb.27: Uterus einer nicht tragenden Färs, subepitheliales Band von Mastzellen im oberen Str. compactum; A: Uteruslumen; 1: Oberflächenepithel; 2: Str. compactum; Giemsa-Färbung**

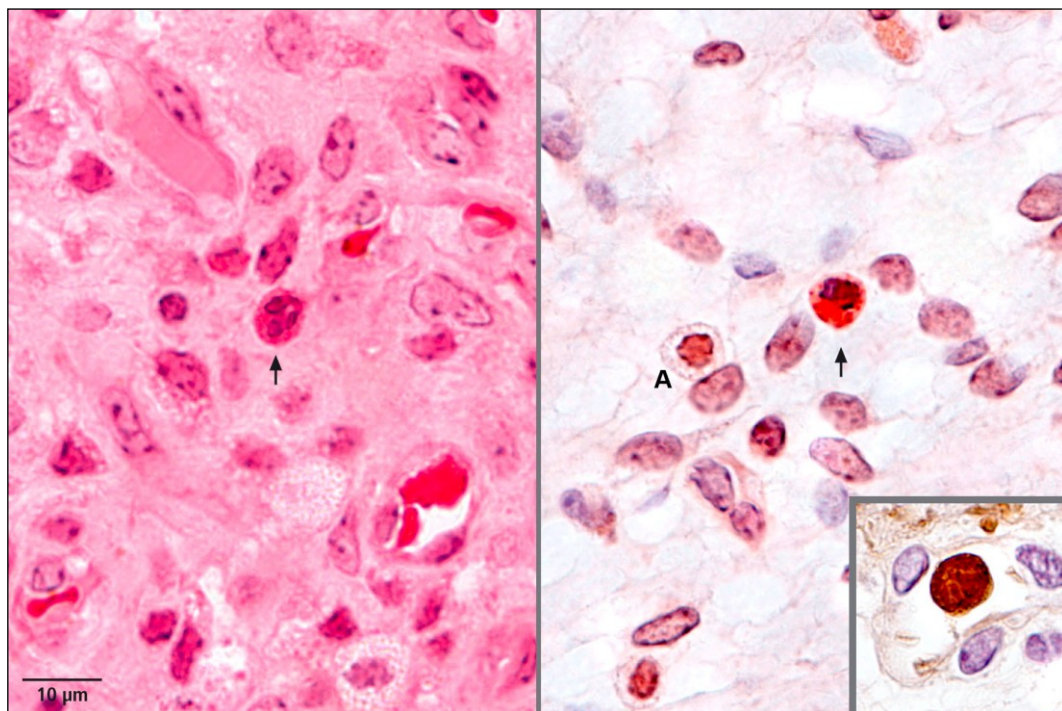


**Abb.28: Uterus einer nicht tragenden Färs, locker eingestreute Mastzellen im Str. spongiosum (links) und streng perivaskulär gelegene Mastzellen im Myometrium (rechts); Giemsa-Färbung**



### 1.2.2.2. Neutrophile Granulozyten

Die Darstellung der neutrophilen Granulozyten (PMN) im HE-gefärbten Präparat erfolgt durch ihre typische Kernform mit mehreren heterochromatinreichen Kernsegmenten und einem homogen rötlich angefärbten Zytoplasma. Enzymhistochemisch lassen sich PMN anhand ihrer Chlorazetat-Esterase darstellen (Abb.29), die allerdings in unterschiedlicher Menge in den Zellen vorhanden zu sein scheint, sodass auch nahezu negative PMN vorkommen. Die Chlorazetat-Esterase-Reaktion ermöglicht das Auffinden der PMN bereits bei geringer Vergrößerung und gibt so leichter einen semiquantitativen Überblick über das Vorkommen dieser Zellart. Die Myeloperoxidase lässt sich mit dem für den Nachweis der Peroxidase in eosinophilen Granulozyten verwendeten Protokoll in PMN nicht sicher erfassen. Immunhistochemisch werden PMN mit dem Antikörper MAC387 gegen Calprotectin, einem Mitglied der Multigenfamilie S-100, neben Makrophagen dargestellt und sind häufig nur schwer von diesen abgrenzbar, da bei dem üblichen starken Reaktionsausfall die Kernmorphologie nicht sicher zu beurteilen ist.

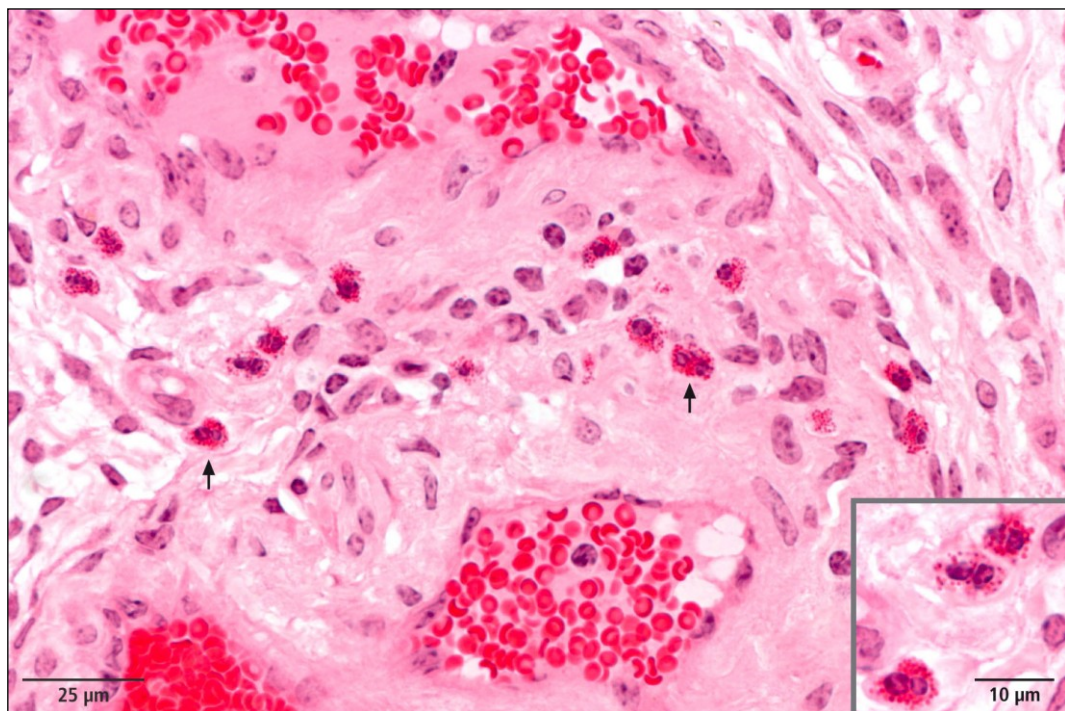


**Abb.29:** Uterus einer nicht tragenden Färs, Neutrophile Granulozyten im HE-Präparat (links) und bei der Chlorazetat-Esterase-Reaktion (rechts); A: eine nicht reagierende Mastzelle; Inset: Immunhistochemie mit AK MAC387

Neutrophile Granulozyten kommen vereinzelt im gesamten Stroma vor, selten innerhalb des Oberflächenepithels und dem Epithel der proximalen Drüsenanteile sowie immer wieder intravasal. Die Häufigkeit ihres Vorkommens im Uterus der Färs ist als sporadisch zu bezeichnen.

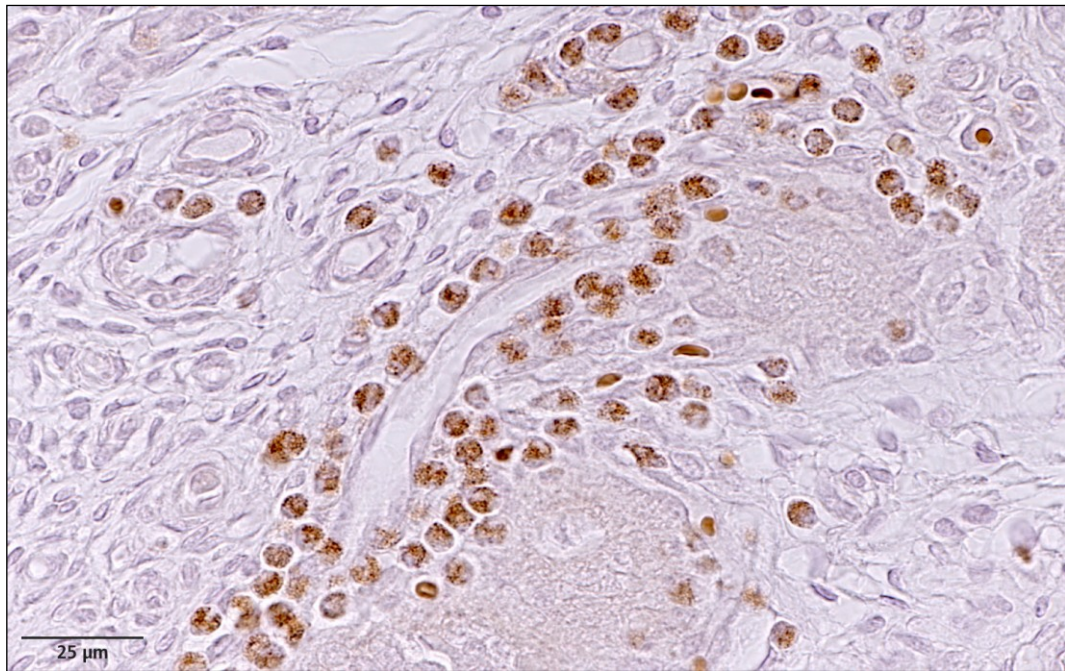
### 1.2.2.3. Eosinophile Granulozyten

Die Darstellung von eosinophilen Granulozyten im HE-gefärbten Präparat erfolgt anhand der deutlich erkennbaren eosinophilen Granula und des meist zweigeklappten Zellkernes (Abb.30). Enzymhistochemisch lassen sich eosinophile Granulozyten mittels ihrer Eosinophilen-Peroxidase-Aktivität, die sich von der Myeloperoxidase unterscheidet, nachweisen. Die Peroxidase-Reaktion ermöglicht das Auffinden der eosinophilen Granulozyten bereits bei geringer Vergrößerung und gibt so leichter einen semiquantitativen Überblick über das Vorkommen dieser Zellart (Abb.31, S.61). Zu beachten ist, dass auch Erythrozyten über eine Peroxidase-ähnliche Enzymaktivität verfügen und sich deshalb ebenfalls anfärben.



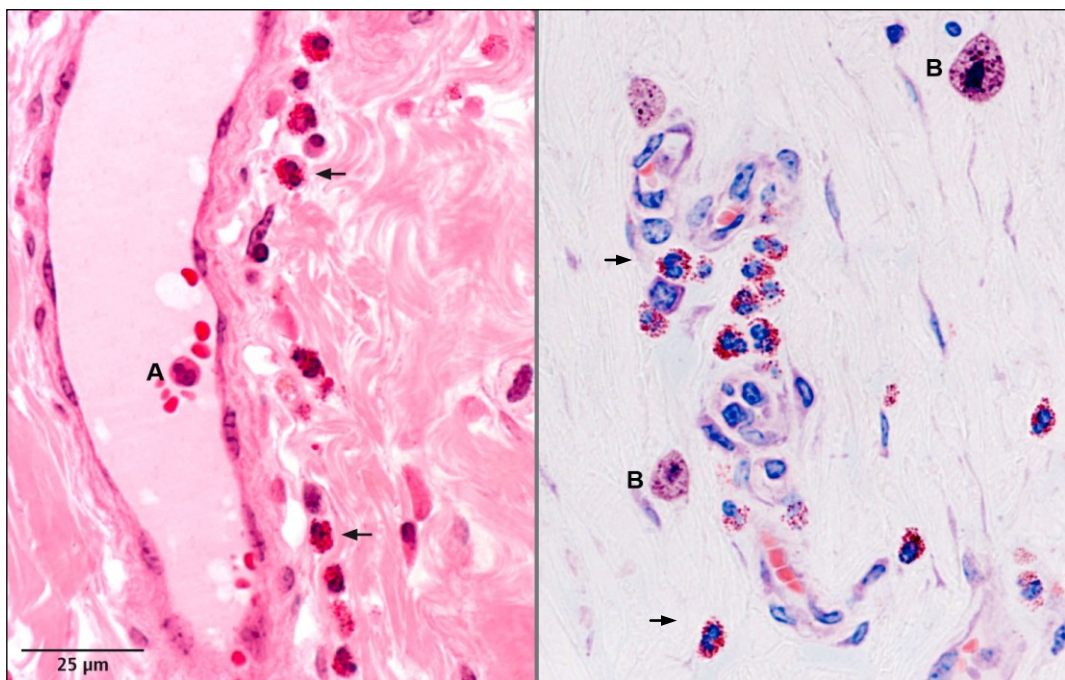
**Abb.30:** Uterus einer nicht tragenden Färs, Eosinophile Granulozyten im HE-Präparat (Pfeile), die betont perivaskuläre Lage der Zellen ist zu erkennen, Inset zeigt Granulation der eosinophilen Granulozyten





**Abb.31:** Uterus einer nicht tragenden Färse, Eosinophile Granulozyten in der Peroxidase-Reaktion; betont perivaskuläre Lage der umfangreicheren Zellansammlung

Eosinophile Granulozyten liegen locker verteilt in allen bindegewebigen Anteilen des Endometriums, wobei eine Bevorzugung des perivaskulären Bereiches dort deutlich zu erkennen ist, wo sich vereinzelt umfangreichere Zellansammlungen finden. Deutliche Ansammlungen von eosinophilen Granulozyten treten auch im lockeren Bindegewebe des *Str. vasculosum* im Myometrium auf (Abb.32).

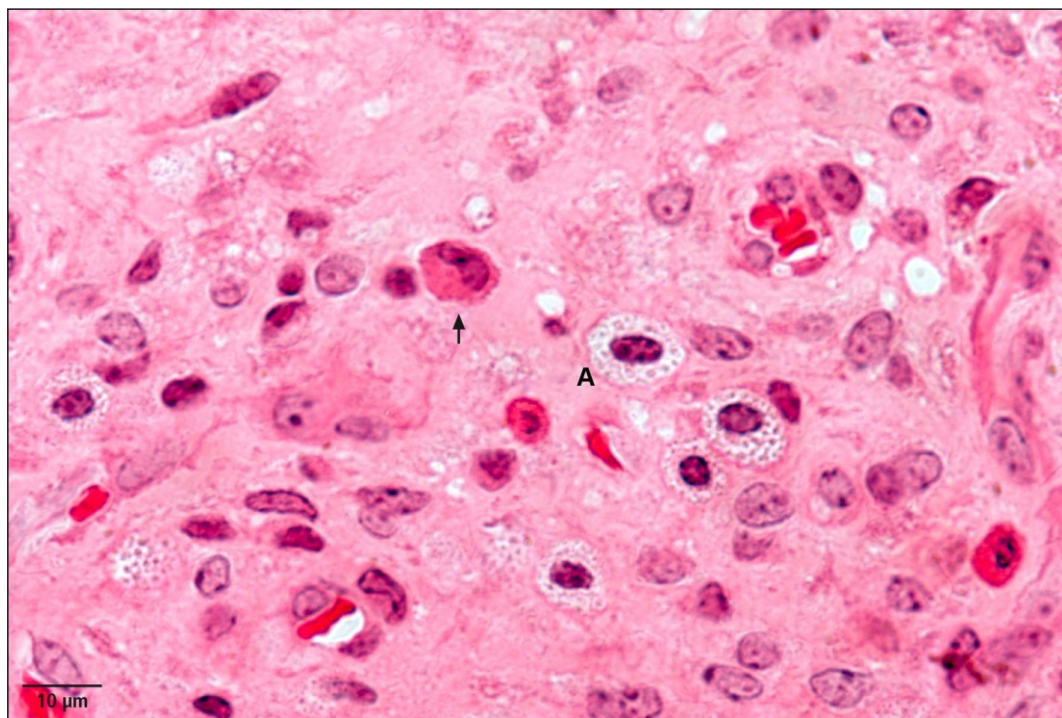


**Abb.32:** Uterus einer nicht tragenden Färse, Eosinophile Granulozyten im *Str. vasculosum* des Myometriums (Pfeile); A: Neutrophiler Granulozyt im Gefäßlumen; B: Mastzellen; links: HE-Färbung, rechts: Giemsa-Färbung

Eosinophile Granulozyten kommen regelmäßig in geringer Anzahl, vereinzelt auch in umfangreicheren perivaskulären Ansammlungen im Endometrium von nicht tragenden Färsen vor.

#### 1.2.2.4. Makrophagen

Makrophagen sind Zellen mit einem größeren Durchmesser, etwa dem von Mastzellen, einem rötlich angefärbten Zytoplasma in der HE-Färbung und einem locker strukturierten bohnenförmigen bis rundlichen Zellkern (Abb.33). Sie treten in allen Anteilen des Stromas auf, sind aber aufgrund ihrer geringen Anzahl häufig nur schwer aufzufinden.

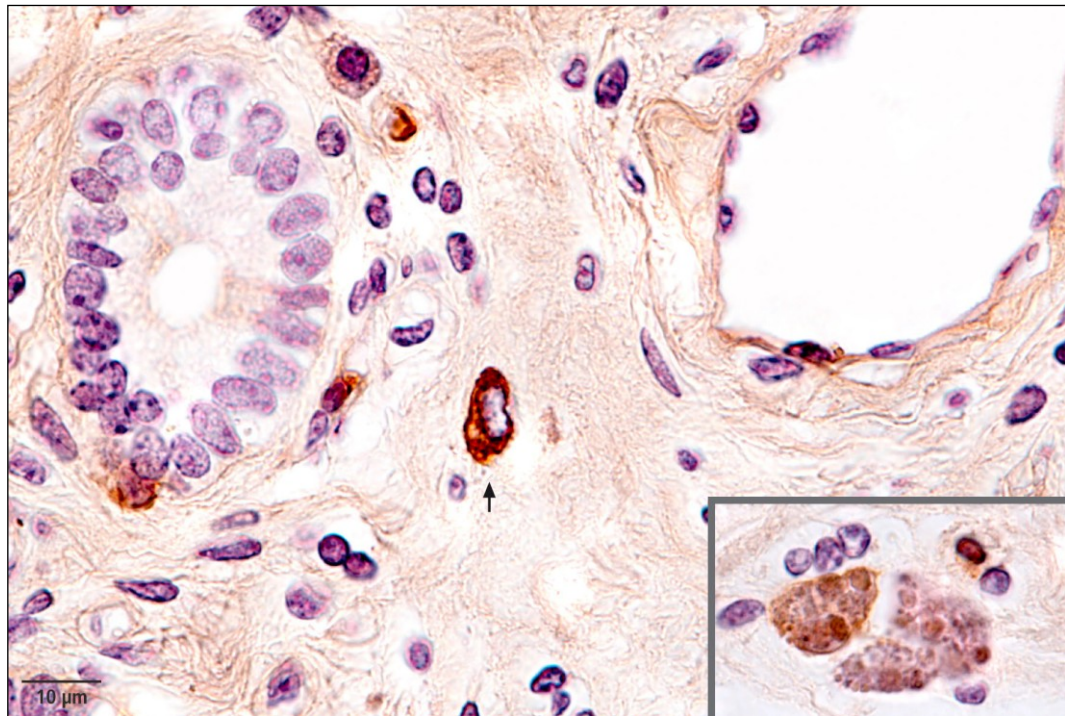


**Abb.33: Uterus einer nicht tragenden Färs, Makrophage im Str. compactum, mit deutlichem, eosinophilen Zytoplasma und einen lockeren bohnenförmigen Zellkern (Pfeil); A: Mastzellen; HE-Färbung**

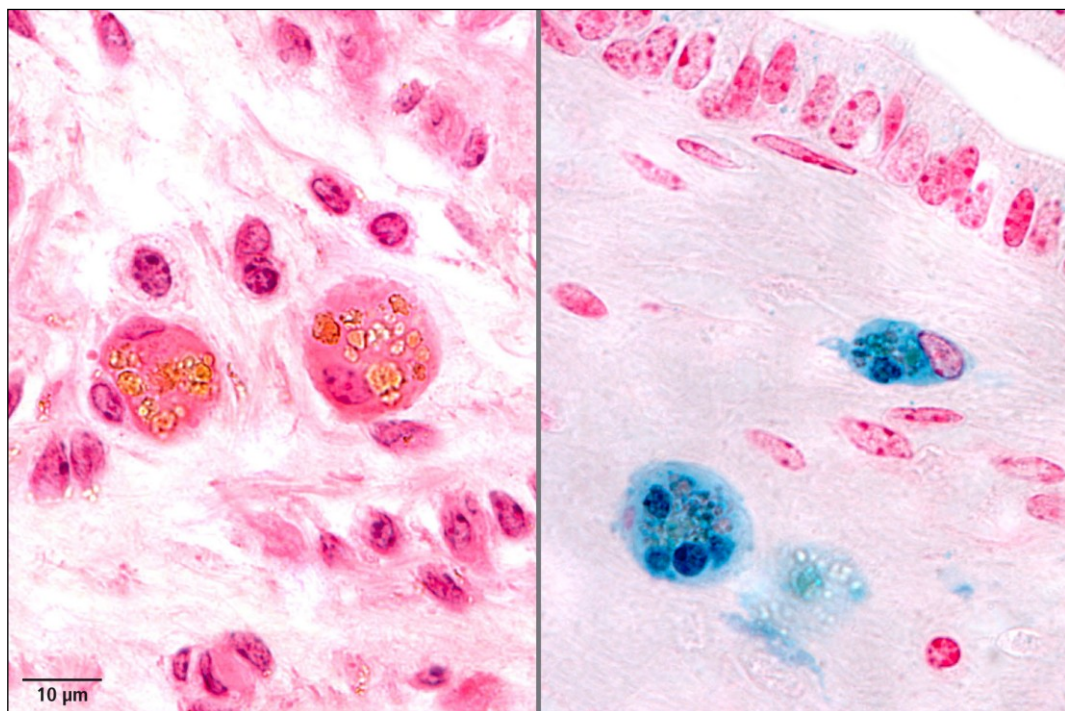
Die immunhistochemische Darstellung der Makrophagen gelingt mit dem Antikörper MAC387 (Calprotectin), wobei die Abgrenzung von den ebenfalls positiv reagierenden neutrophilen Granulozyten schwer fällt (Abb.34, S.63).

Als Abkömmlinge der Makrophagen kommen regelmäßig, wenn auch in unterschiedlicher Menge, Pigment-Makrophagen im Stroma vor (Abb.35, S.63). In ihrem umfangreichen Zytoplasma liegen Schollen eines Pigmentes mit bräunlicher Eigenfarbe. Der positive Eisennachweis zeigt, dass es sich bei dem Pigment sehr wahrscheinlich um Hämosiderin handelt.





**Abb.34:** Uterus einer nicht tragenden Färse, Makrophage in der immunhistochemischen Reaktion mit dem Antikörper MAC387 (Pfeil). Inset: die Reaktion in den Pigment-Makrophagen ist deutlich schwächer, ein Teil der Färbung ist durch die Eigenfarbe des Pigmentes bedingt

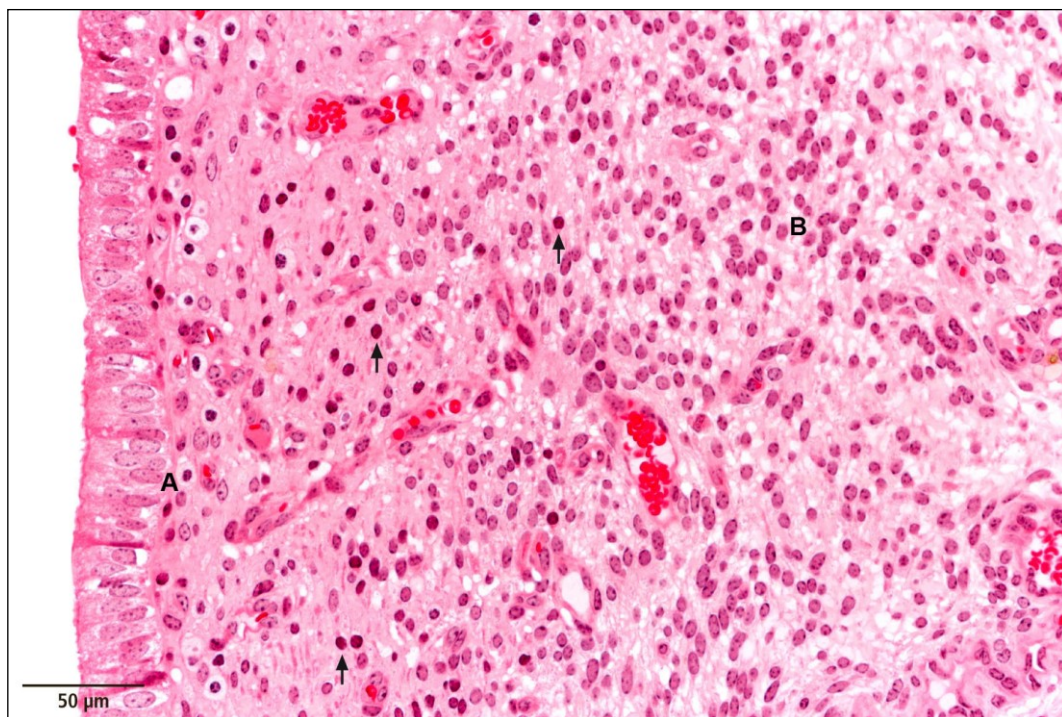


**Abb.35:** Uterus einer nicht tragenden Färse, Pigment-Makrophagen, große Zellen mit braunen Pigmentschollen im umfangreichen Zytoplasma, das eine positive Eisenreaktion aufweist; links: HE-Färbung, rechts: Perls-Färbung.

Die Pigment-Makrophagen liegen einzeln oder in kleinen Gruppen von bis zu fünf Zellen. Eine bevorzugte Lokalisation im Stroma scheint es nicht zu geben. Die immunhistochemische Reaktion mit dem Antikörper MAC387 fällt deutlich schwächer als in den Makrophagen aus (Abb.34, Inset).

### 1.2.2.5. Lymphozyten

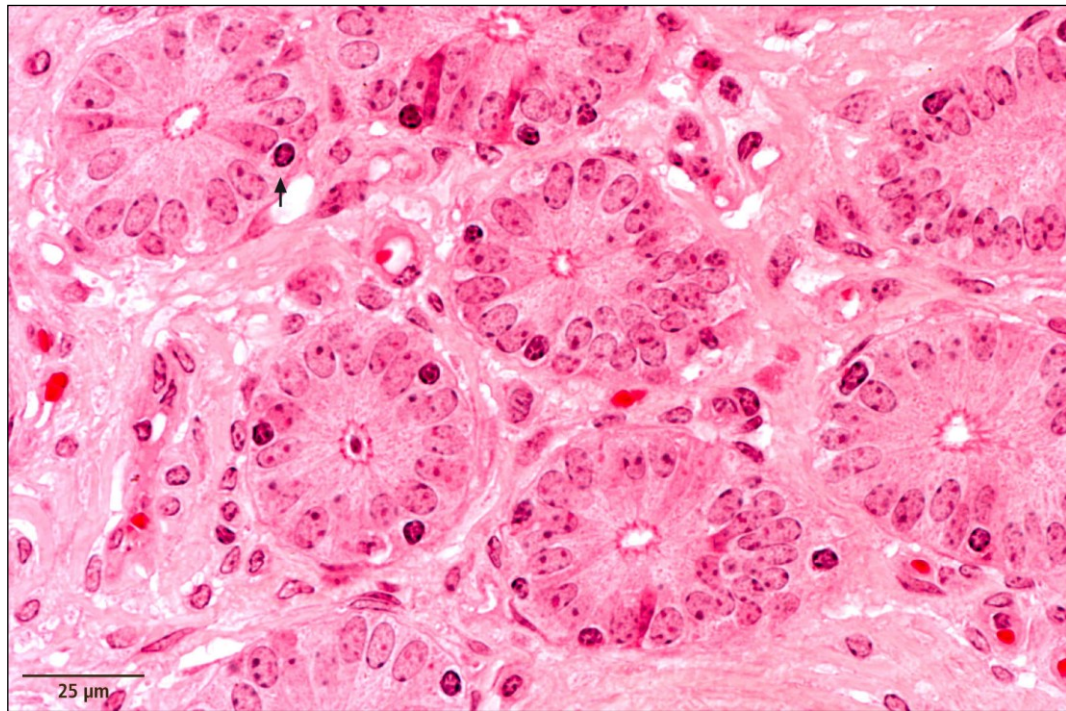
Bei den Lymphozyten handelt es sich ganz überwiegend um kleine Lymphozyten mit einem dunklen, heterochromatinreichen Zellkern und einem wenig bis gar nicht erkennbarem Zytoplasma (Abb.36). Diese kleinen Lymphozyten kommen im Stroma oder intraepithelial vor und hier vor allem im Drüsenepithel und weniger häufig im Oberflächenepithel. Im Stroma treten sie einzeln oder in Form von Lymphozyten-Aggregaten auf. Während die Lymphozyten in den Aggregaten und intraepithelial sicher zu identifizieren sind, können einzeln liegende Lymphozyten vor allem im *Str. compactum* mit Zellkernen von Mastzellen oder Stromazellen verwechselt werden. Aus diesem Grund ist die Quantifizierung der einzeln liegenden Lymphozyten im Stroma erschwert, eine wesentlich verlässlichere Abschätzung ermöglicht die immunhistochemische Darstellung der Lymphozyten-Subpopulationen (vgl.auch Abb.40 bis Abb.43).



**Abb.36:** Uterus einer nicht tragenden Färs, Lymphozyten, die einzeln im Stroma liegen (Pfeile); A: Mastzelle mit rundlichem Zellkern; B: Zellkerne der Zellen des *Str. compactum*; beide Zellarten können aufgrund der ähnlichen Zellkerne mit kleinen Lymphozyten verwechselt werden; HE-Färbung

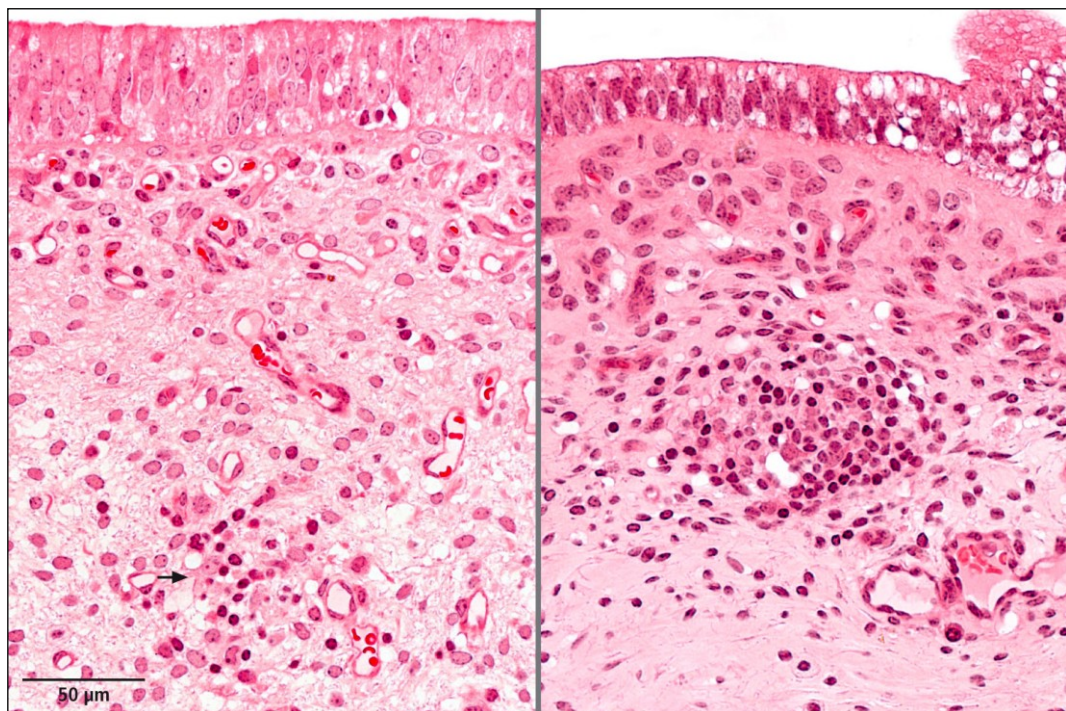
Intraepitheliale Lymphozyten finden sich regelmäßig, vor allem in den distalen Abschnitten der Drüsen, wo man zwischen einer und fünf Zellen pro Drüsenanschnitt finden kann (Abb.37, S. 65).





**Abb.37: Uterus einer nicht tragenden Färs; intraepitheliale Lymphozyten (Pfeil) zwischen Epithelzellen der distalen Anschnitte der Uterindrüsen gelegen, die Lymphozyten sind eindeutig zu erkennen; HE-Färbung**

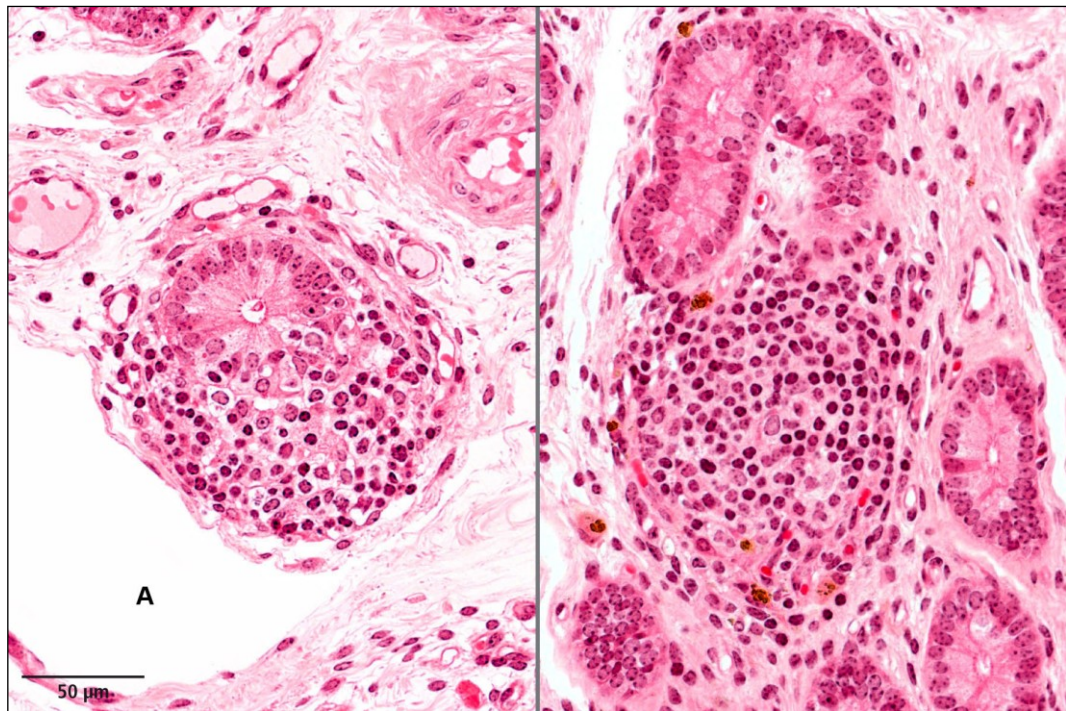
Lymphozyten-Aggregate treten nicht bei allen Färsen auf. Der Umfang der Aggregate reicht von wenigen Zellen (Abb.38) bis hin zu großen Aggregaten mit zahlreichen Lymphozyten (Abb.39, S.66).



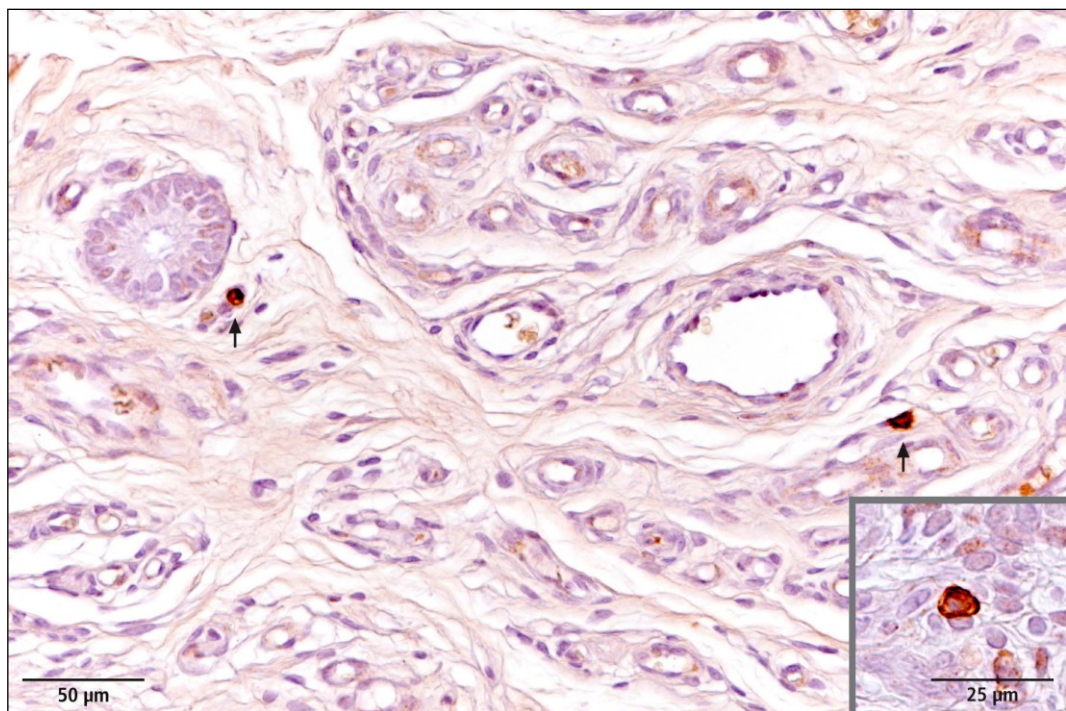
**Abb.38: Uterus einer nicht tragenden Färs; Lymphozyten-Aggregate in Str. compactum, die nur wenige Zellen (links) oder eine größere Anzahl von Lymphozyten (rechts) umfassen; HE-Färbung**



Bei den nicht tragenden Färsen mit Aggregaten finden sich ein bis zwei Ansammlungen pro Schnitt, eine bevorzugte Lage im Stroma ist nicht zu erkennen.

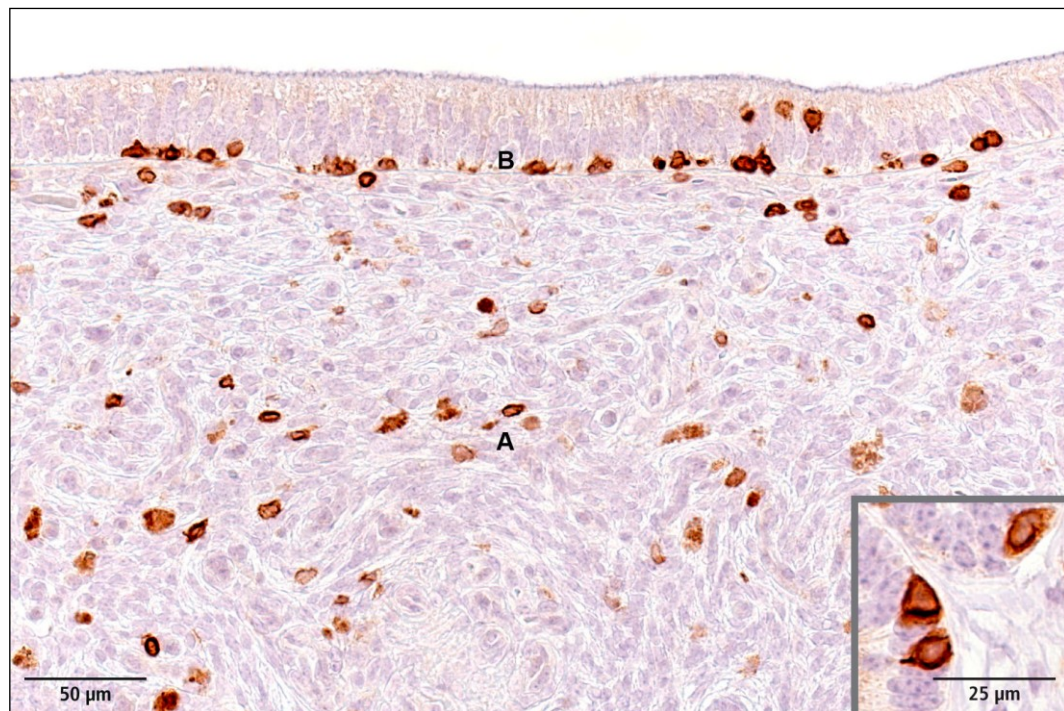


**Abb.39:** Uterus einer Färs, Lymphozyten-Aggregate; umfangreiche Ansammlungen, die unmittelbaren Kontakt mit einer Drüse und einer Lymphkapillaren (A) haben (links) oder frei im Str. spongiosum liegen (rechts); HE-Färbung



**Abb.40:** Uterus einer Färs; immunhistochemische Darstellung von B-Lymphozyten mittels eines Antikörpers gegen CD20, nur sehr vereinzelte Zellen liegen frei im Stroma (Pfeile), Inset: Detailaufnahme

Der ganz überwiegende Teil der einzeln liegenden Lymphozyten im Stroma sind T-Lymphozyten (Abb.41), ebenso wie alle intraepithelialen Lymphozyten (Abb.42) und nahezu alle Zellen in den Lymphozyten-Aggregaten (Abb.43, S.68).

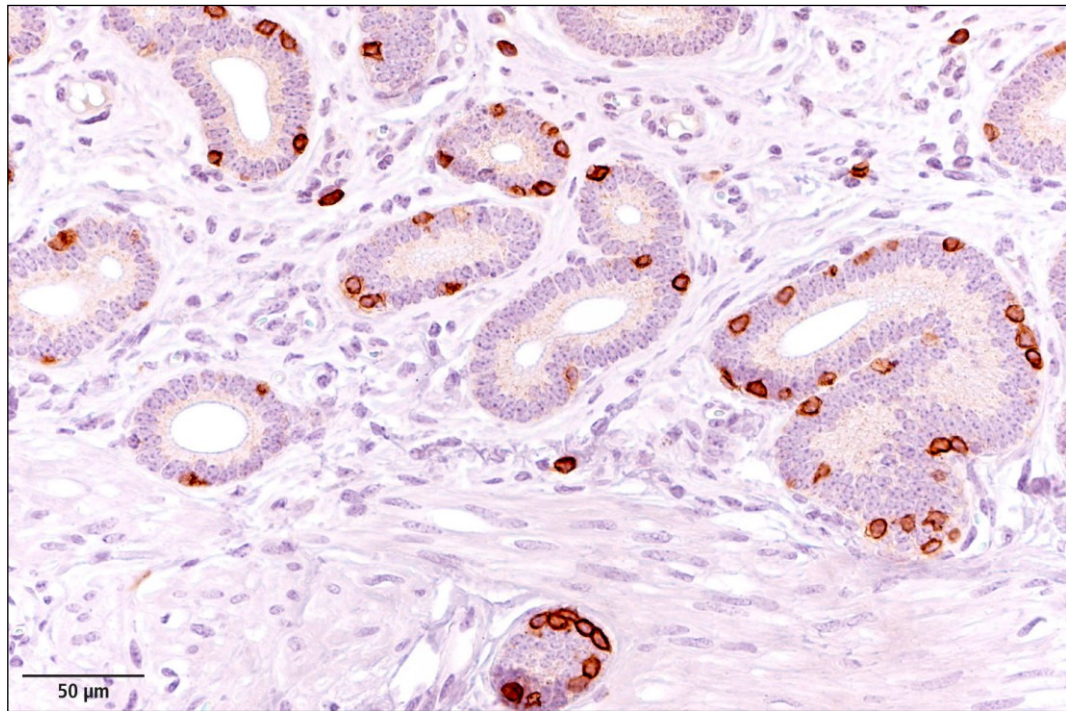


**Abb.41: Uterus einer Färse; immunhistochemische Darstellung von T-Lymphozyten mittels eines Antikörpers gegen CD3; die Zellen liegen einzeln im Stroma (A) sowie intraepithelial im Oberflächenepithel (B); Inset: Detailaufnahme**

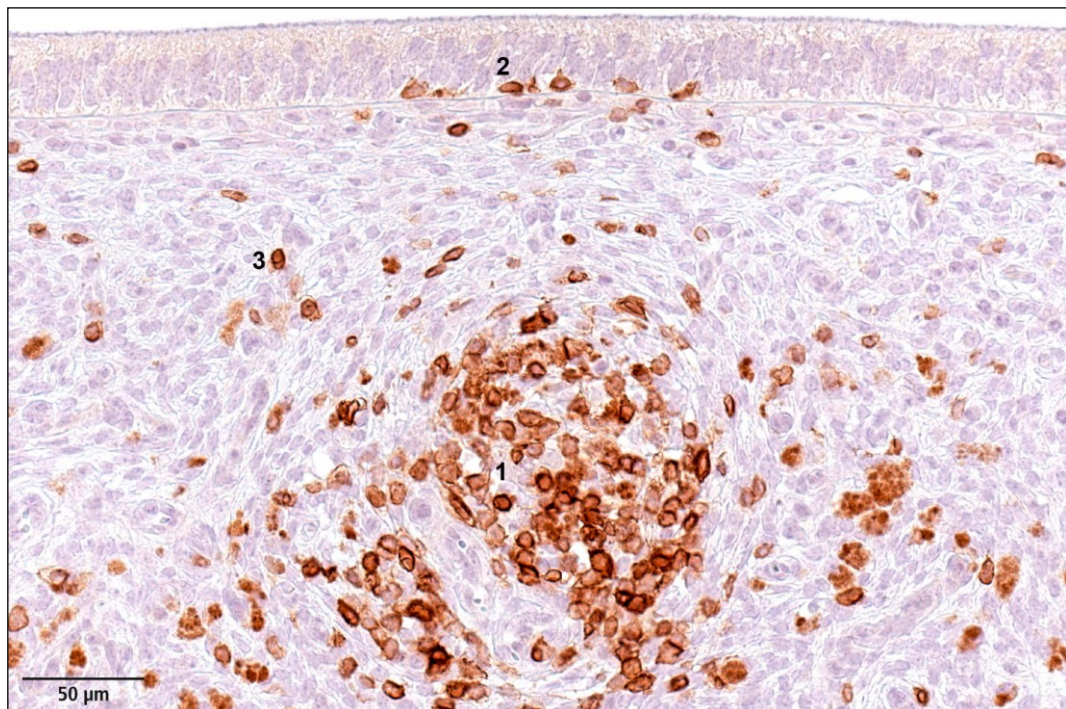
Eine sichere quantitative Abschätzung des Vorkommens von Lymphozyten insgesamt sowie die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten ermöglicht die Immunhistochemie. Die Darstellung der T-Lymphozyten erfolgt mittels eines kreuzreagierenden Antikörpers gegen CD3 (Epitop in der Epsilon-Kette des T-Zellrezeptors) und die der B-Lymphozyten mit einem kreuzreagierenden Antikörper gegen CD 20 (Membranprotein). B-Lymphozyten liegen einzeln in geringer Anzahl im Stroma (Abb. 40), tendenziell vermehrt im *Str. compactum*.

Die Immunhistochemie gestattet auch die Abgrenzung der überwiegend aus T-Lymphozyten bestehenden Lymphozyten-Aggregate von Lymph-Follikeln, die, neben einem kleinen Anteil von T-Lymphozyten und speziellen Stromazellen, ganz überwiegend aus B-Lymphozyten bestehen müssten.





**Abb.42: Uterus einer Färs; immunhistochemische Darstellung von T-Lymphozyten mittels eines Antikörpers gegen CD3; intraepitheliale Lymphozyten in den distalen Abschnitten der Uterindrüsen**



**Abb.43: Uterus einer Färs; immunhistochemische Darstellung von T-Lymphozyten mittels eines Antikörpers gegen CD3; 1: umfangreiches Aggregat von T-Lymphozyten; 2: intraepitheliale Lymphozyten im Oberflächenepithel; 3: einzeln liegende Lymphozyten im Str. compactum**

### 1.2.2.6. Plasmazellen

Plasmazellen sind mittelgroße Zellen mit einem deutlichen, in der HE-Färbung rötlichblau angefärbten Zytoplasma, in dem sich eine juxtanukleäre Aufhellung findet; der exzentrisch gelegene Zellkern ist heterochromatinreich und kann eine sog. Radspeichenstruktur zeigen (Abb.44, S.69). In der Färbung nach Giemsa sind die Plasmazellen leicht an ihrem deutlich angefärbten Zytoplasma (Ergastoplasma) zu erkennen. Plasmazellen kommen in geringer Menge vor, sie liegen meist einzeln und nur gelegentlich in kleinen Gruppen im Stroma, bevorzugt im *Str. compactum*.

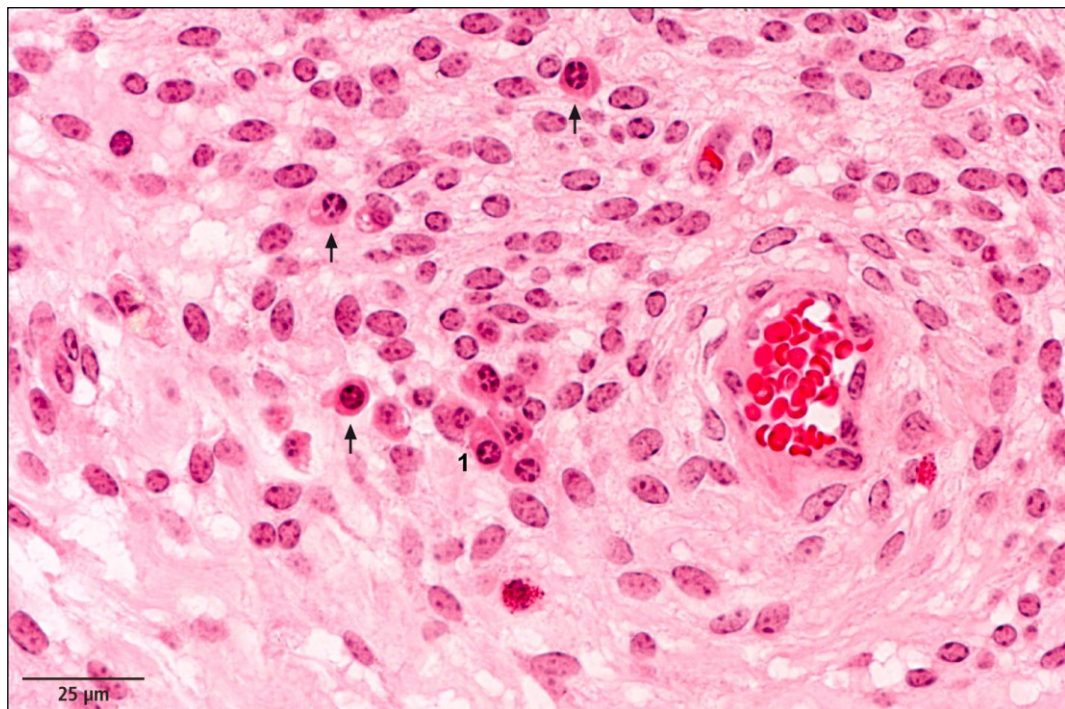


Abb.44: Uterus einer Färse; Plasmazellen, einzeln im Str. compactum liegend (Pfeile), deutlich angefärbtes umfangreicheres Zytoplasma, Zellkerne mit Radspeichenstruktur; 1: kleinherdige Ansammlung von Plasmazellen; HE-Färbung

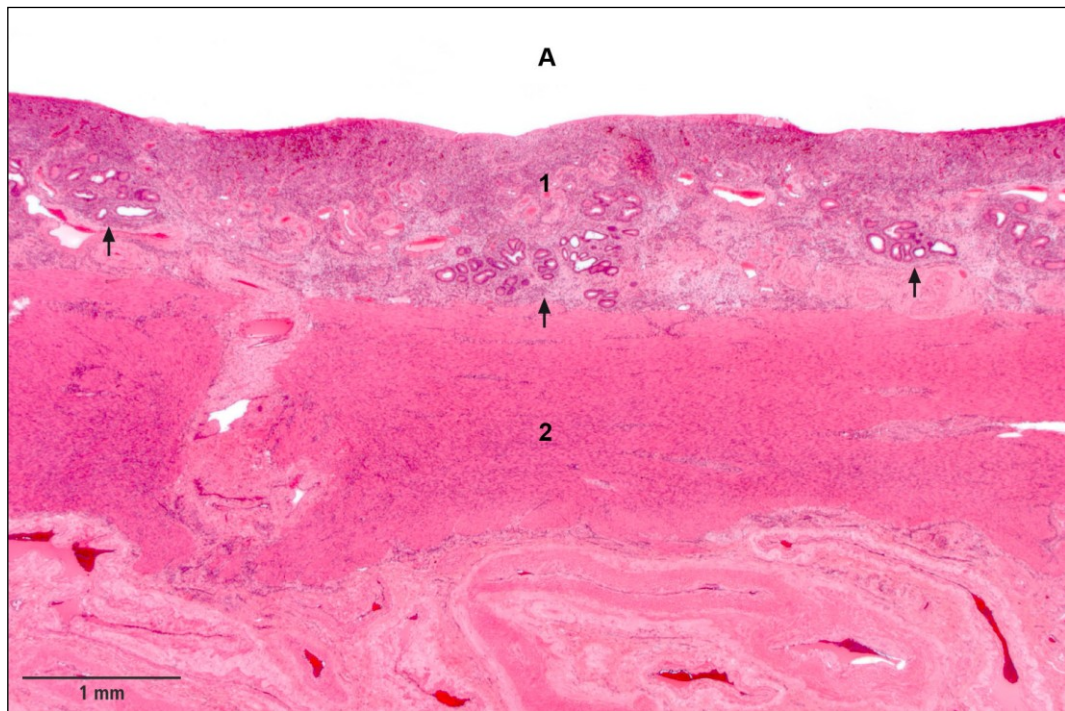
### **1.3. Untersuchungen an klinisch erkrankten Uteri**

#### **1.3.1. Pathologische Veränderungen**

Um histologische Befunde bei Rindern mit chronischer oder subklinischer Endometritis sicher einordnen zu können, werden die Befunde einerseits bei nicht tragenden Färsen, adulten gynäkologisch klinisch gesunden Tieren mit sehr wahrscheinlich unverändertem Endometrium, und andererseits bei Kühen mit einer chronischen, katarrhalisch-eitrigen Endometritis, Tieren mit dem wahrscheinlich höchsten Grad von histologischen Veränderungen am Endometrium, dargestellt. Es wurden die Uteri von 10 Tieren untersucht, an den pro Uterus 16 Proben bewertet wurden.

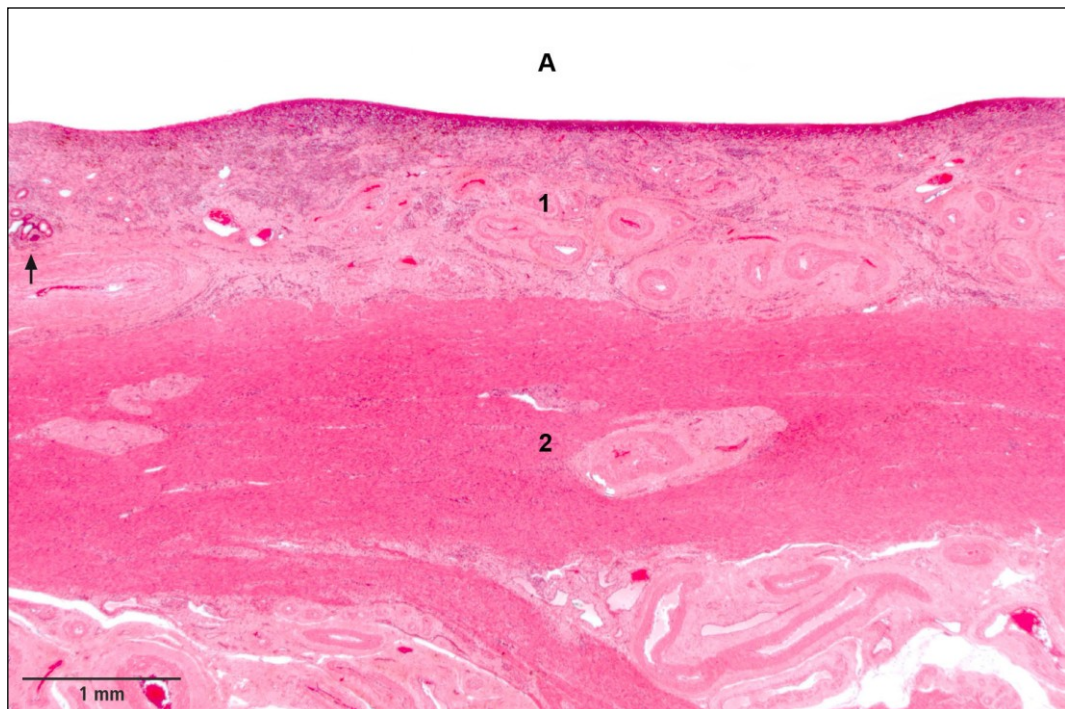
Während die Befunde bei den nicht tragenden Färsen sehr detailliert als Normalbefunde des Rinder-Endometriums beschrieben worden sind (siehe Kapitel 1.2.), sollen die Veränderungen bei der Endometritis purulenta nur insoweit beschrieben werden, als es deutliche Abweichungen von den Befunden bei den nicht tragenden Färsen gibt. Diese sind insbesondere: Gehalt an neutrophilen Granulozyten, Gehalt an Plasmazellen, Umfang der Lymphozyten-Aggregate, Endometrose und Läsionen am Oberflächen- und Drüsenepithel. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Anzahl von Drüsenanschnitten deutlich reduziert ist (Abb.45 und Abb.46, S.71).





**Abb.45: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; Übersicht, die Anzahl der Drüsenanschnitte (Pfeile) ist reduziert; 1: Endometrium; 2: Myometrium; A: Uteruslumen; HE-Färbung**

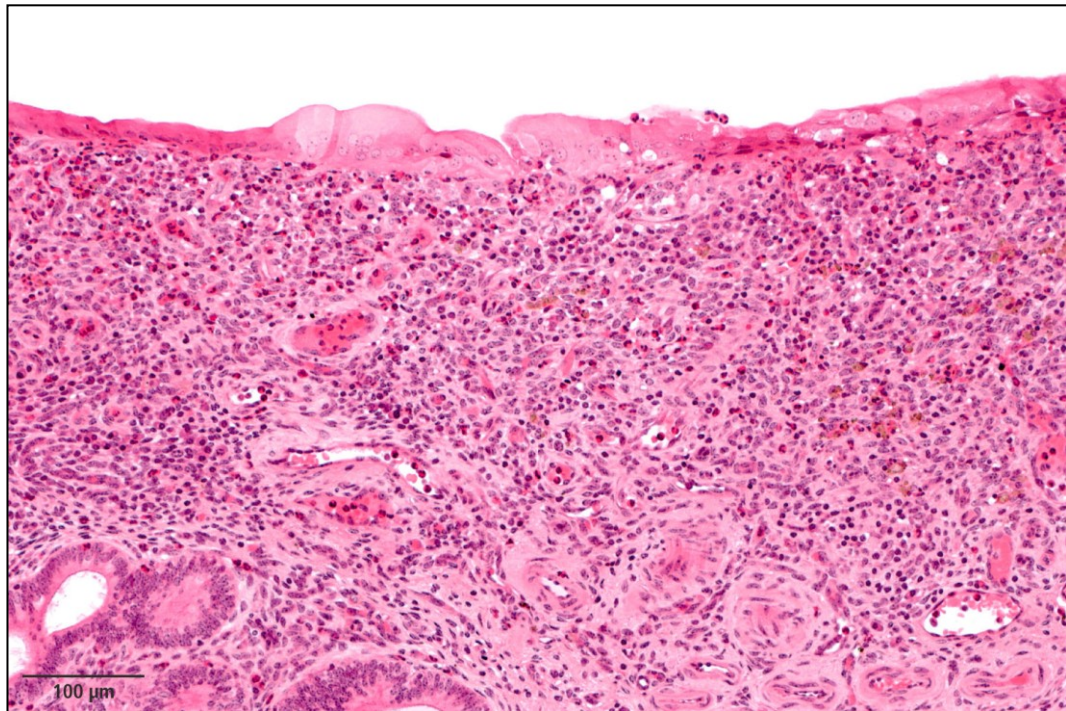
Vereinzelt ziehen intakte Drüsen vom Uteruslumen bis an das Myometrium. Abschnittsweise sind größere Bereiche des Endometriums frei von Uterindrüsen. Der drüsenfreie Raum wird von Ansammlungen von Entzündungszellen und von dickwandigen Blutgefäßen eingenommen.



**Abb.46: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; Übersicht, im Bildausschnitt findet sich ein einziger Drüsenanschnitt (Pfeil); 1: Endometrium; 2: Myometrium; A: Uteruslumen; HE-Färbung**

### Veränderungen am Oberflächenepithel

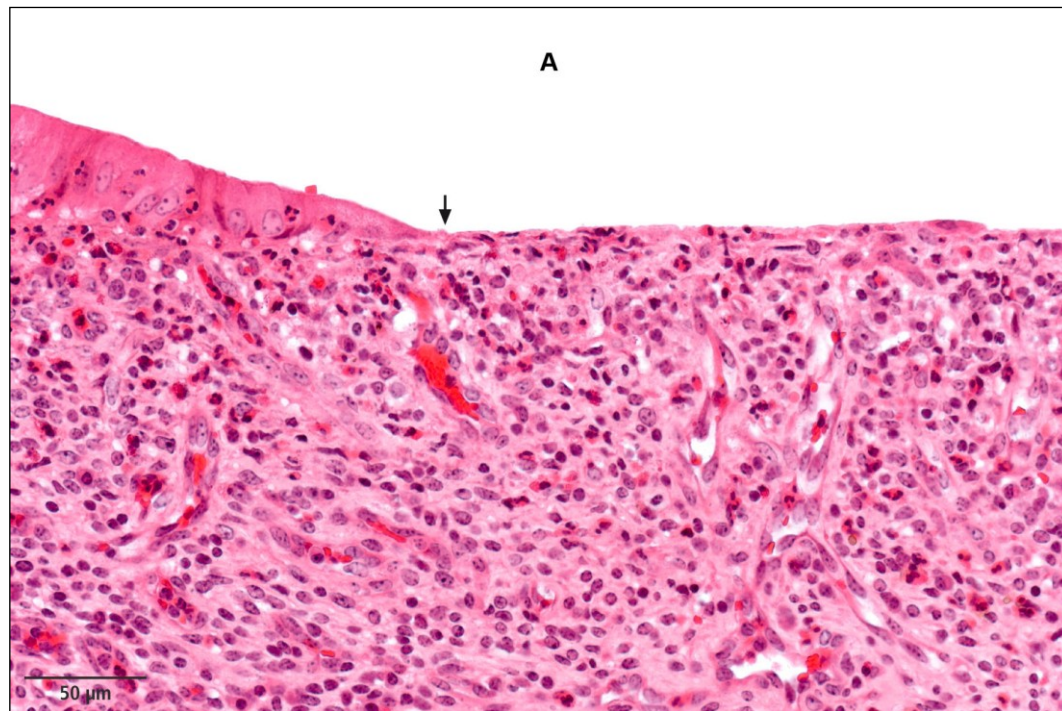
Neben unverändertem Oberflächenepithel sind zwei Arten von Veränderungen zu beobachten: Man findet regelmäßig Abschnitte im Oberflächenepithel, in denen die Zellen hochgradig vergrößert und unregelmäßig angeordnet sind (Abb.47). Das Bild entspricht am ehesten einer trüben Schwellung, also der intrazytoplasmatischen Einlagerung von Wasser; ein Untergang dieser Zellen ist nicht sicher zu erkennen.



**Abb.47: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta, Oberflächenepithel mit einer abschnittweisen hochgradigen Vergrößerung der Zellen, HE-Färbung**

Ebenso regelmäßig kommt es zu einem herdförmigen Verlust des Oberflächenepithels, also zu Erosionen bzw. Ulzera der Schleimhaut (Abb.48, S.73). Wie sich der Zellverlust abspielt, ist ebenfalls nicht zu erkennen.





**Abb.48: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta, abschnittweiser Verlust des Oberflächenepithels (rechts vom Pfeil) im Sinne einer Erosion oder eines Ulkus, der Grund bzw. Ablauf des Zellunterganges ist nicht zu erkennen; A: Uteruslumen; HE-Färbung**

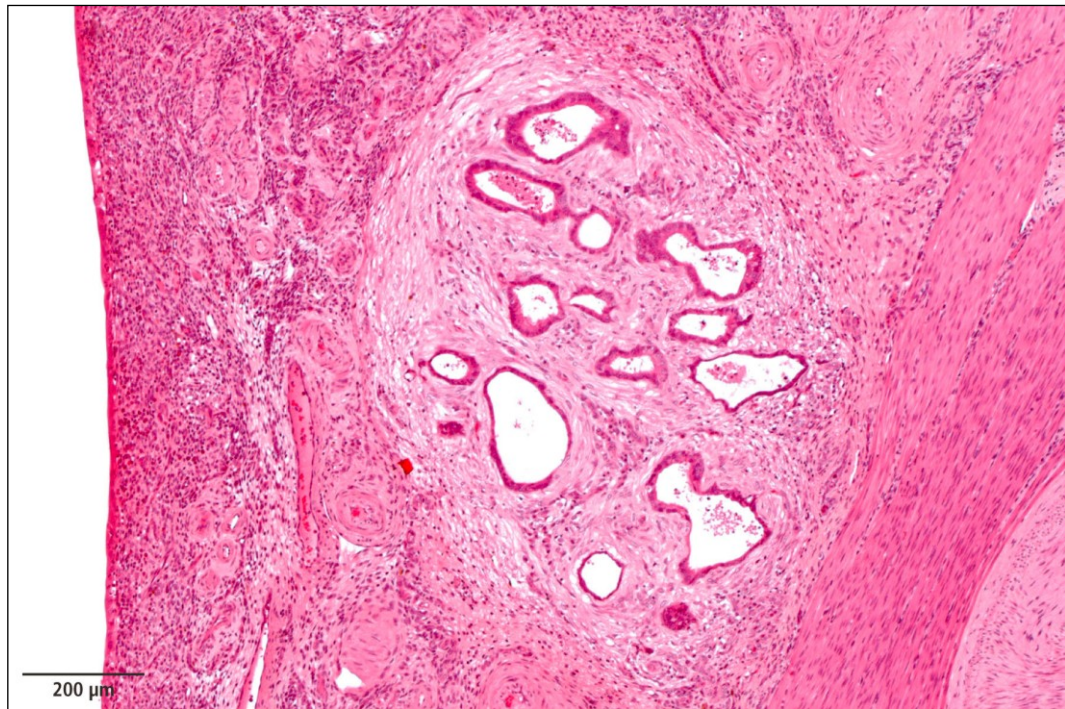
#### Gefäße

Die endometrialen Gefäße der Kühe mit Endometritis purulenta unterscheiden sich in zwei Punkten von denen der nicht tragenden Färsen. Die Lymphkapillaren im *Str. spongiosum* sind unauffällig und nur schwer zu identifizieren. Ferner sind die Durchmesser und die Wandstärke der großen Arterien gegenüber denen der Färsen deutlich größer.

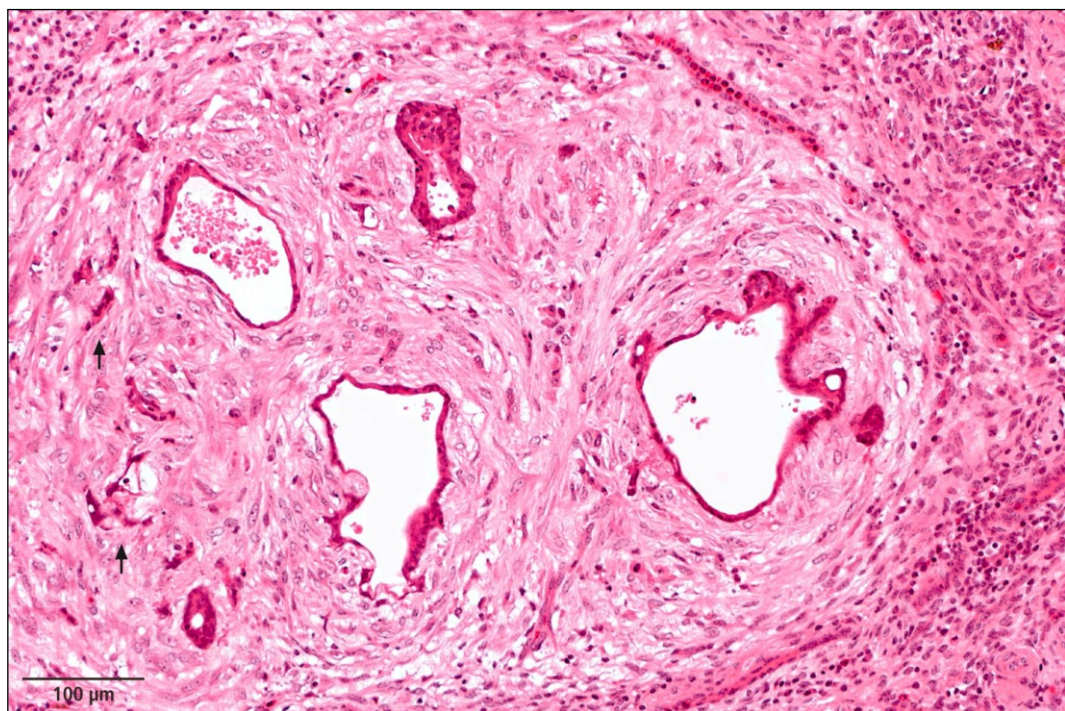
#### Endometrose

Findet sich die Endometrose, gekennzeichnet durch Zunahme des Durchmessers des Drüsenlumens, Abflachung und vermehrte Basophilie der Drüsenzellen sowie periglanduläre Fibrose ohne höhergradige Infiltration durch freie Zellen, bei nicht tragenden Färsen nur sehr vereinzelt, so tritt diese bei Kühen mit *Endometritis purulenta* regelmäßig auf (Abb.49 und Abb.50, S.74). Während der Zustand der Drüsenepithelzellen dem der nicht tragenden Färsen entspricht, ist das Ausmaß an periglandulärer Fibrose eindeutig größer. Außerdem kommt es gleichzeitig zur Atrophie der Drüsen, die teilweise nur noch in Form strangförmiger Zellverbände angeordnet sind (Abb.50, S.74). Freie Zellen treten nicht eindeutig vermehrt auf.





**Abb.49: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta, Endometrose; nestförmige Anordnung von Drüsen in einem konzentrisch geschichteten Bindegewebe; die Lumina der Drüsen sind erweitert und unregelmäßig geformt, die Drüsenzellen selbst unterschiedlich stark abgeflacht; HE-Färbung**

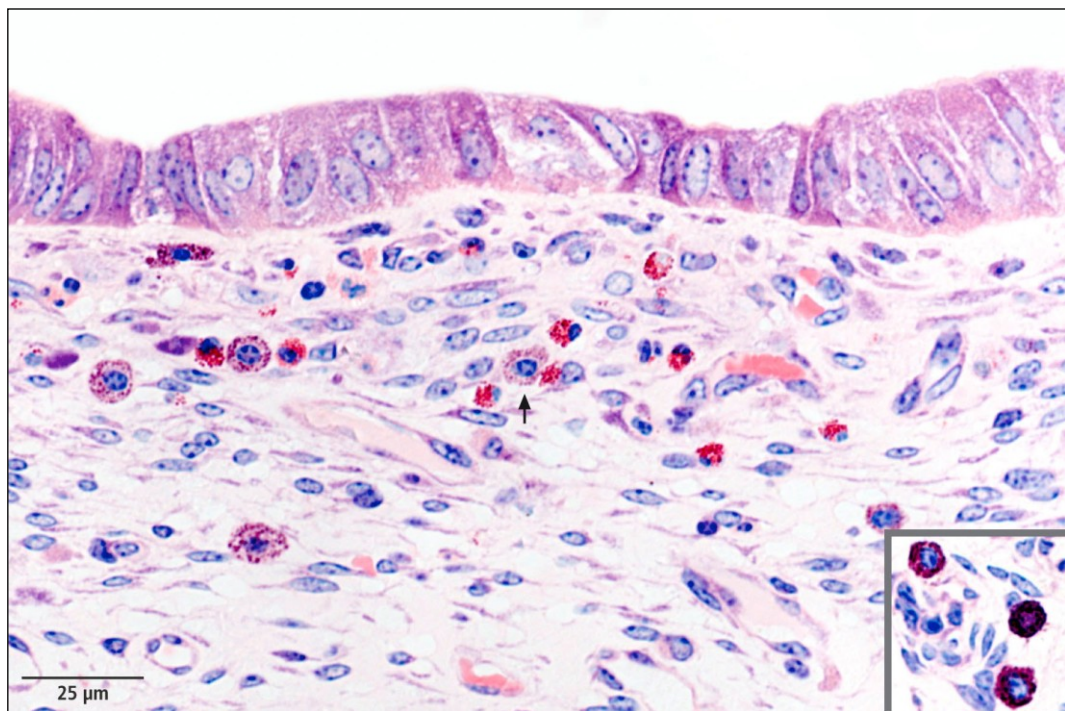


**Abb.50: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta, Endometrose; neben den dilatierten Drüsen findet man auch atrophische Drüsenanschnitte (Pfeile), das Bindegewebe ist faserreich, eine eindeutige Infiltration mit freien Zellen ist nicht zu erkennen; HE-Färbung**

### 1.3.2. Freie Zellen im Endometrium

#### 1.3.2.1. Mastzellen

Die Mastzellen, die bei nicht tragenden Färsen in einem lockeren subepithelialen Band angeordnet sind, lassen sich bei Kühen mit Endometritis purulenta in dieser Form nicht erkennen. Unverändert finden sich Mastzellen hingegen im *Str. spongiosum* und im lockeren Bindegewebe des Myometriums. Die subepithelialen Mastzellen scheinen durch die umfangreichen Ansammlungen von Plasmazellen verdrängt zu sein. Dort, wo Mastzellen in subepithelialer Lage zu finden sind, weisen sie weniger zytoplasmatische Granula im Vergleich zu Zellen in tieferen Schichten auf (Abb.51).

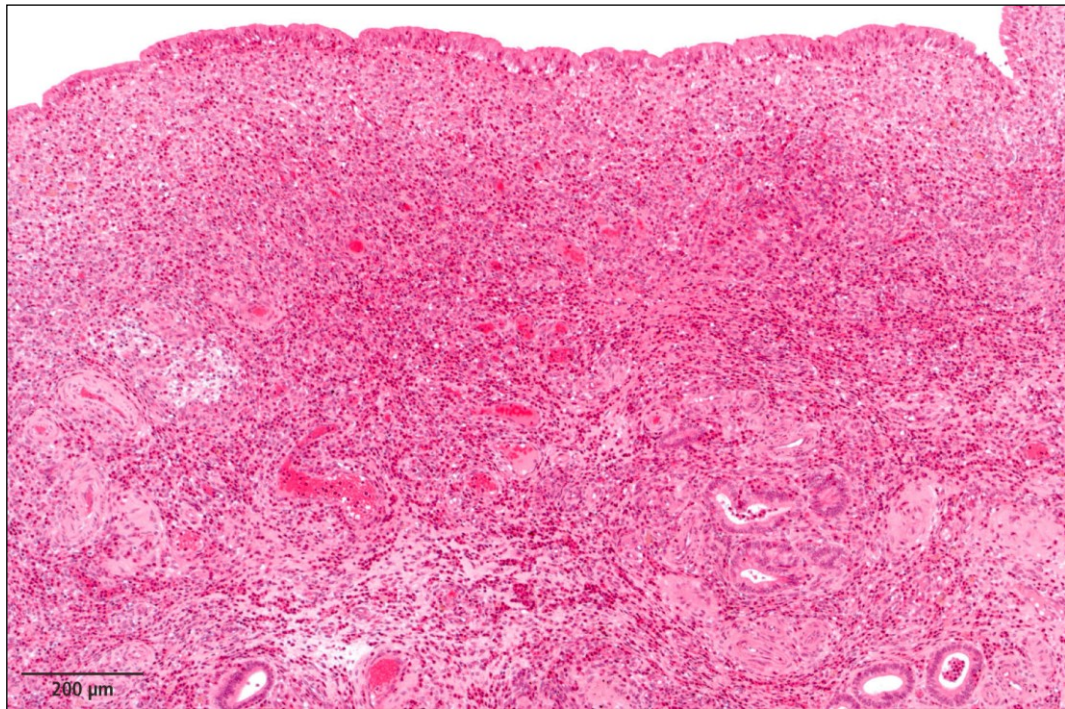


**Abb.51:** Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; Mastzellen im subepithelialen Str. compactum weisen deutlich weniger Granula (Pfeil) als Zellen in tieferen Schichten (Inset) auf; neben den Mastzellen eosinophile Granulozyten, Giemsa-Färbung

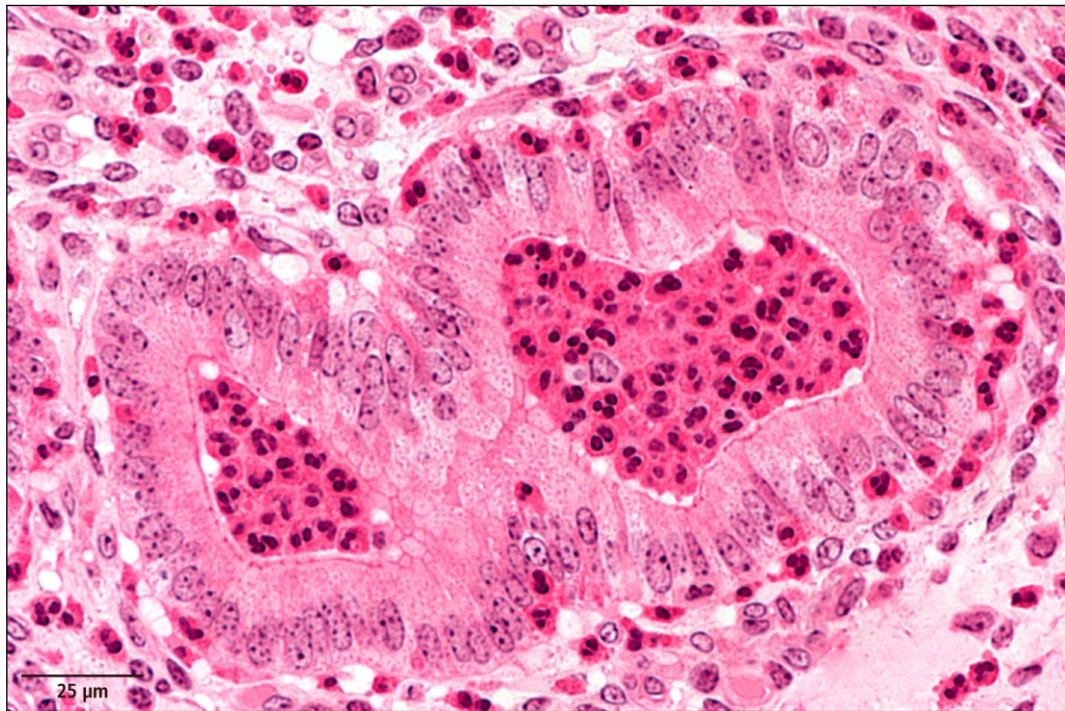


### 1.3.2.2. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten sind, neben Plasmazellen, die dominierenden Entzündungszellen bei der Endometritis purulenta. Dabei zeigt die große Mehrheit der Zellen keine Zerfallstendenz; es kommt somit nicht zu einer Einschmelzung des Gewebes. Die neutrophilen Granulozyten liegen in dichten Ansammlungen im *Str. compactum* und weniger zahlreich im *Str. spongiosum* (Abb.52).



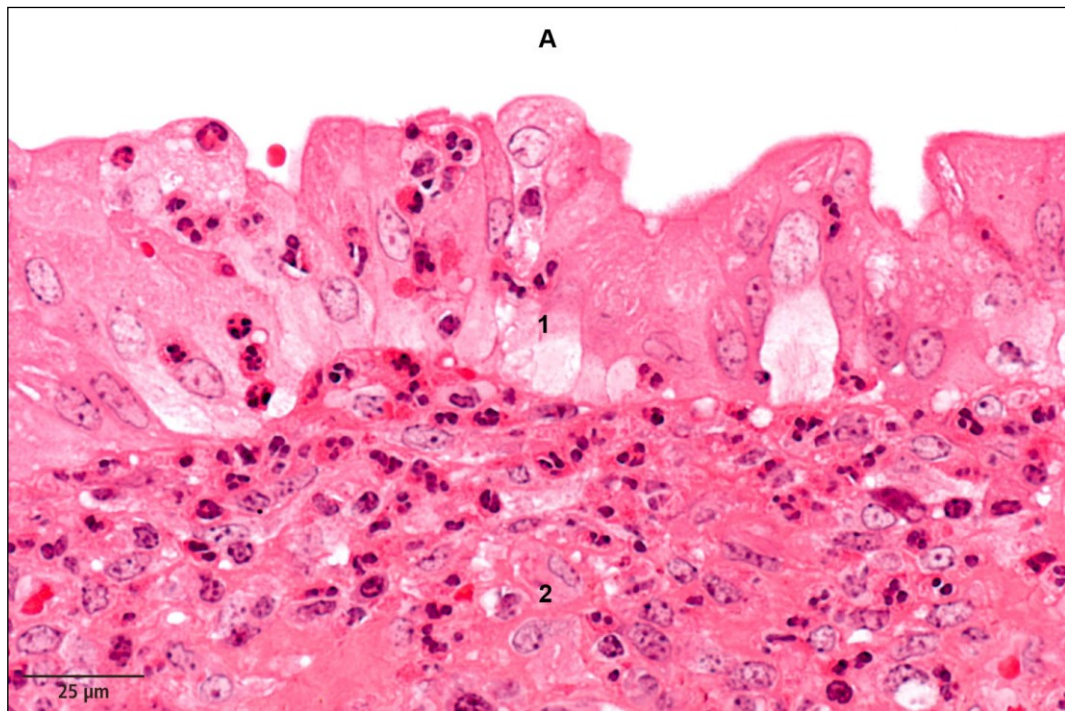
**Abb.52: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; dichte Ansammlung von überwiegend neutrophilen Granulozyten im Endometrium, insbesondere im Stratum compactum, die Anzahl der Drüsenanschnitte ist hochgradig reduziert; HE-Färbung**



**Abb.53: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; Ansammlung von neutrophilen Granulozyten im Lumen von Uterindrüsen. Die Zellen zeigen keine Zerfallstendenz, dementsprechend gibt es auch keine erkennbaren Schäden am Drüsenepithel; HE-Färbung**

Regelmäßig finden sich Drüsenanschnitte, in deren Lumen dicht gepackt neutrophile Granulozyten liegen (Abb.53). In den meisten Fällen sind keine Veränderungen des Drüsenepithels zu erkennen. Im Oberflächen- und Drüsenepithel findet man regelmäßig eine geringe Anzahl von neutrophilen Granulozyten, die die Schleimhaut durchwandern (Abb.54, S.78).



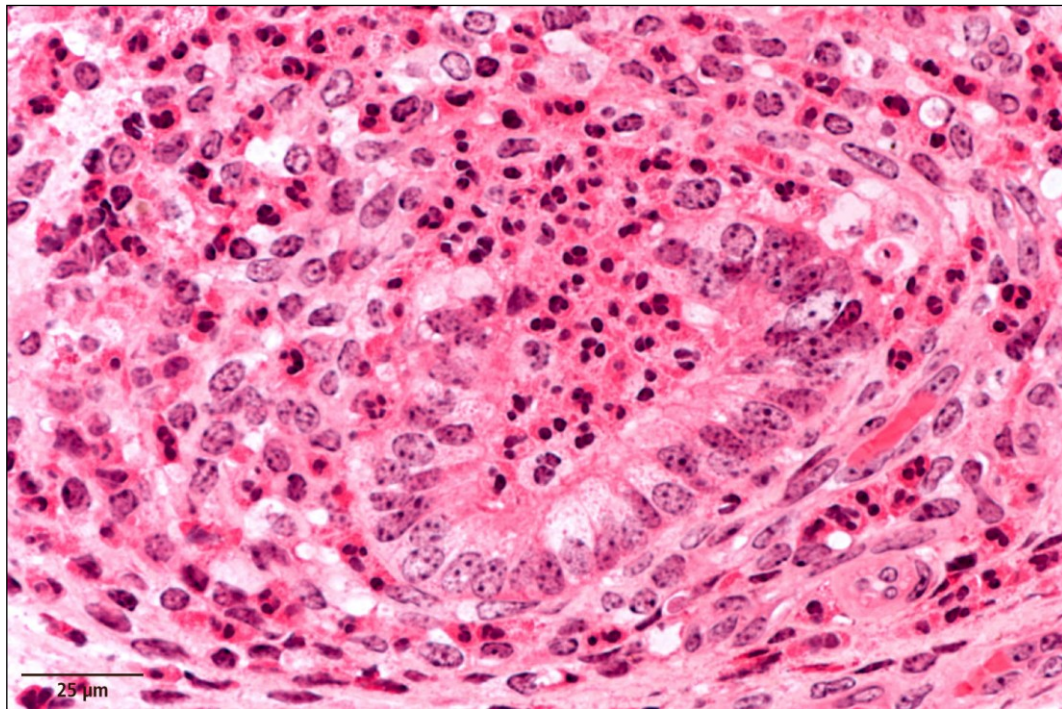


**Abb.54: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; Neutrophile Granulozyten durchwandern das Oberflächen-Epithel; 1: Oberflächenepithel; 2: Stratum compactum; A: Uteruslumen; HE-Färbung**

Vereinzelt gibt es umfangreichere Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten in den weiten Lumina der Lymphgefäße im *Stratum spongiosum*. Akuter Untergang von Oberflächenepithel oder Drüsenepithel (Abb.55, S.79) ist eher selten; auch hier lassen die neutrophilen Granulozyten eine eindeutige Zerfallstendenz vermissen.

Es handelt sich bei der Endometritis purulenta deshalb tatsächlich um eine katarrhalisch-eitrige Entzündung, die wegen der fehlenden Zerfallstendenz der neutrophilen Granulozyten ohne höhergradige Schädigungen des Endometrium, wie Einschmelzung des Gewebes, einhergeht.





**Abb.55: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; abschnittweiser Untergang des Drüsenepithels, der Raum ist von zahlreichen neutrophilen Granulozyten eingenommen; HE-Färbung**

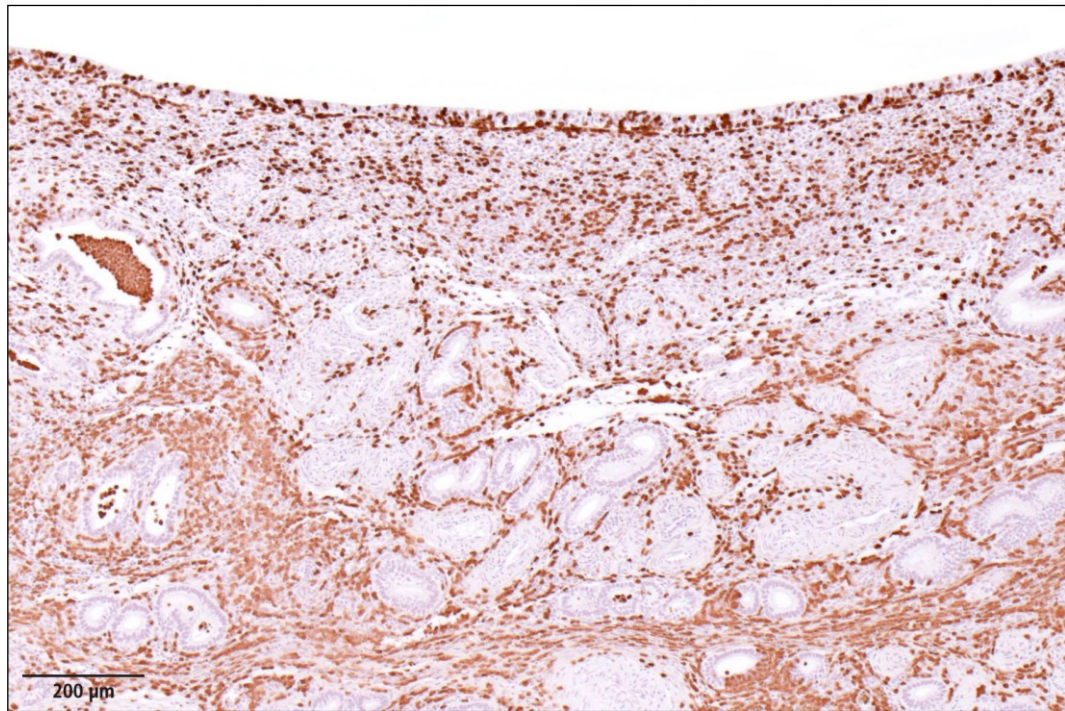
#### **1.3.2.3. Eosinophile Granulozyten**

Das Vorkommen von eosinophilen Granulozyten bei Kühen mit chronischer katarrhalisch-eitriger Endometritis entspricht dem bei nicht tragenden Färsen; sie sind in meist geringer Menge im Bindegewebe von Endo- und Myometrium verteilt. Einzelne Tiere weisen herdförmig umfangreichere Ansammlungen von eosinophilen Granulozyten auf; ein eindeutiger Zusammenhang mit dem Vorkommen hypogranulierter Mastzellen ist nicht zu erkennen.

#### **1.3.2.4. Makrophagen**

Makrophagen, die nicht phagozytiert haben, sind zwischen den sehr zahlreichen anderen Entzündungszellen nicht eindeutig zu erkennen. Die immunhistochemische Darstellung mit dem Antikörper gegen Calprotectin (MAC387) wird durch die gleichzeitige Markierung von neutrophilen Granulozyten erheblich beeinträchtigt (

Abb.56, S.80). Pigmentmakrophagen treten im Vergleich zu Färsen, bei identischer Verteilung, vermehrt auf.

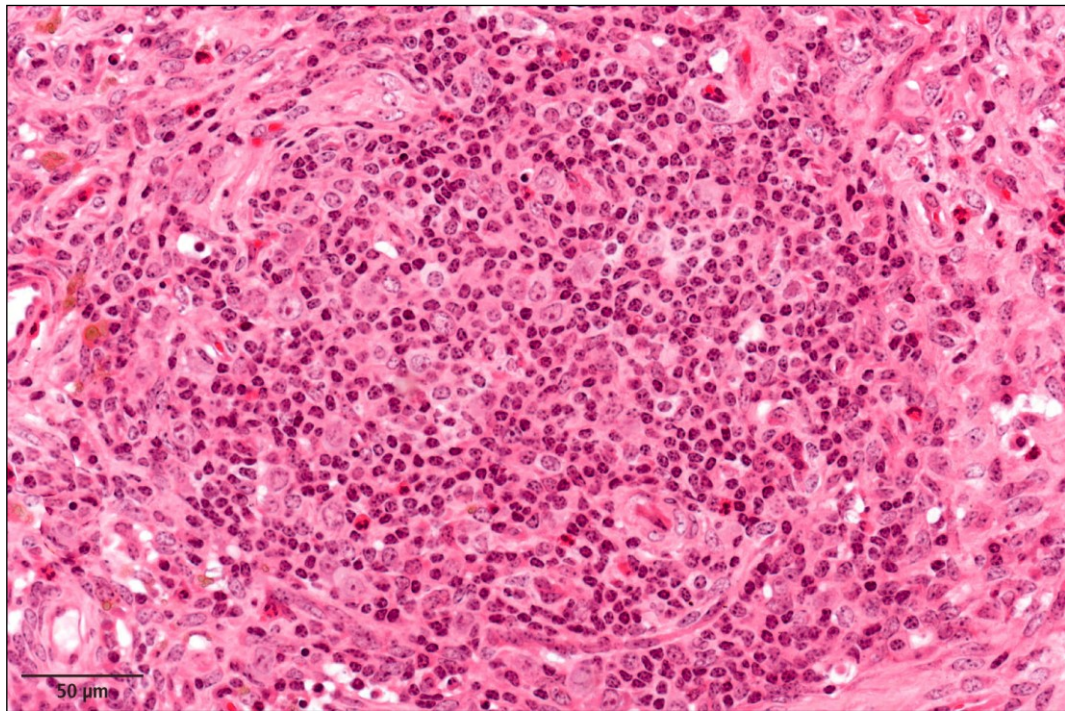


**Abb.56: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; die immunhistochemische Darstellung des myeloischen Markers MAC387 erfasst insbesondere die sehr zahlreichen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen sind nicht eindeutig abzugrenzen**

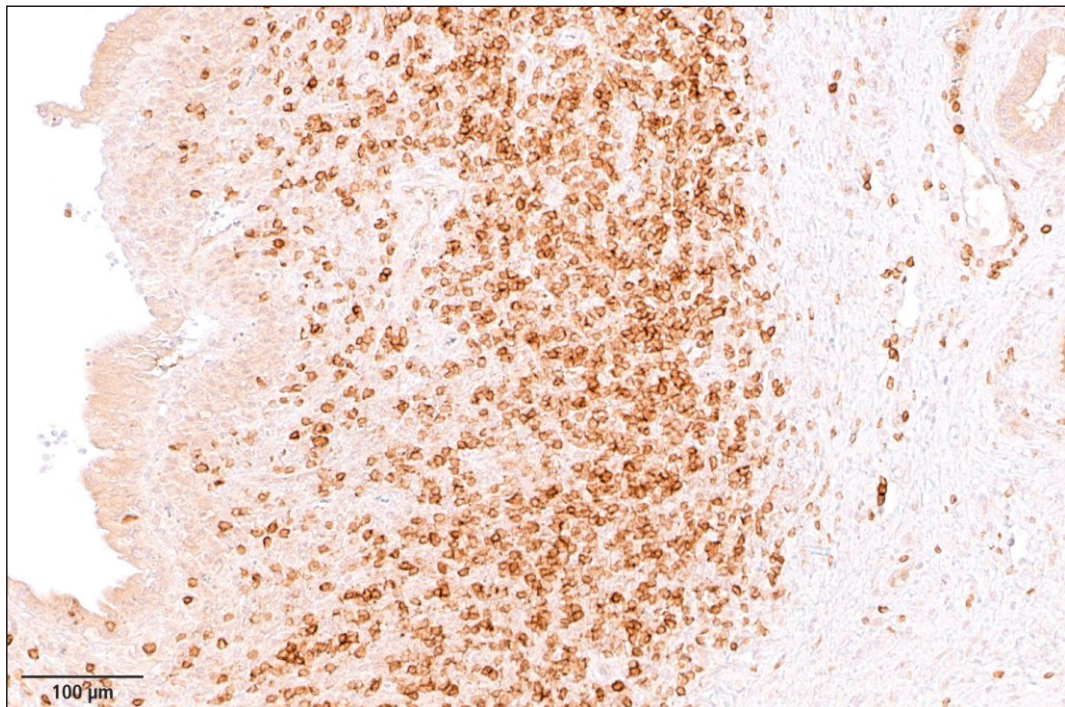
#### **1.3.2.5. Lymphozyten**

Ein weiterer deutlicher Unterschied zum Endometrium bei Färsen betrifft die Lymphozyten. Es treten regelmäßig vermehrte, großherdige Aggregate von Lymphozyten auf (Abb.57, S.81), die sich immunhistochemisch überwiegend als CD 3-positive T-Lymphozyten erweisen (Abb.58, S.81). Daneben finden sich, vor allem in Bereichen mit vielen Entzündungszellen, helle Herde (Abb.59, S.82), die sich bei höherer Vergrößerung als nunmehr an Lymphozyten verarmte Lymphozyten-Aggregate erweisen („ausgebrannte Aggregate“) (Abb.60, S.82).



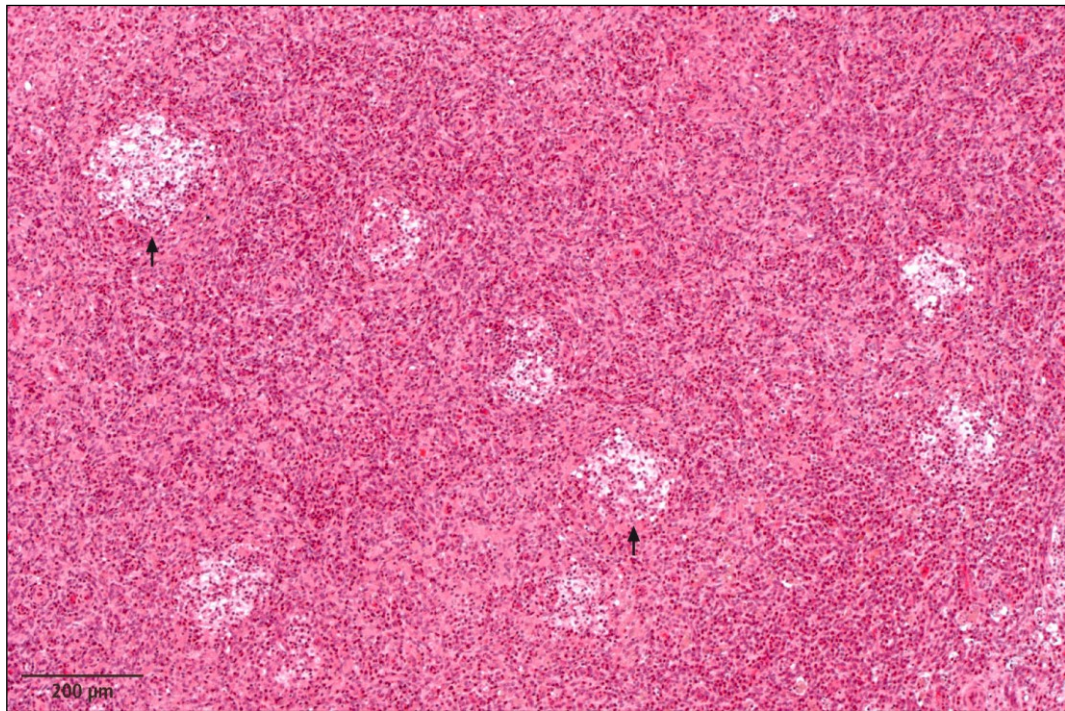


**Abb.57: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; Lymphozyten-Aggregat, vor allem aus kleinen Lymphozyten bestehend; HE-Färbung**

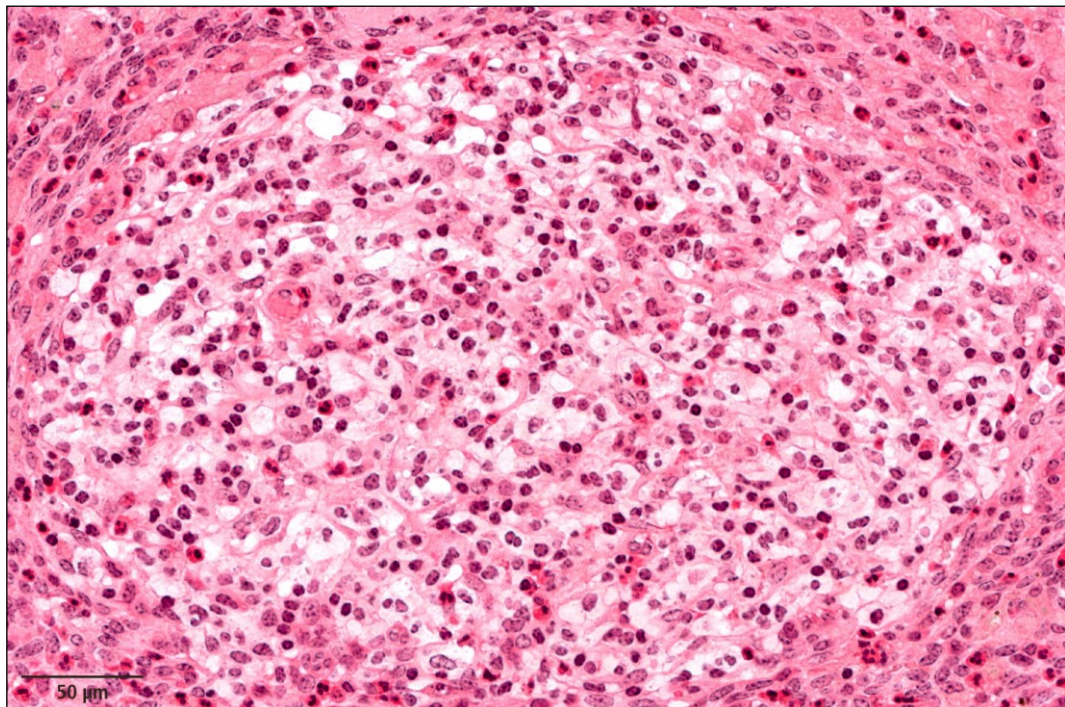


**Abb.58: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta, die Lymphozyten sind immunhistochemisch ganz überwiegend CD3 positiv**





**Abb.59: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta, zahlreiche zellarme, helle Herde (Pfeile) in einem dichten Entzündungszell-Infiltrat: HE-Färbung**

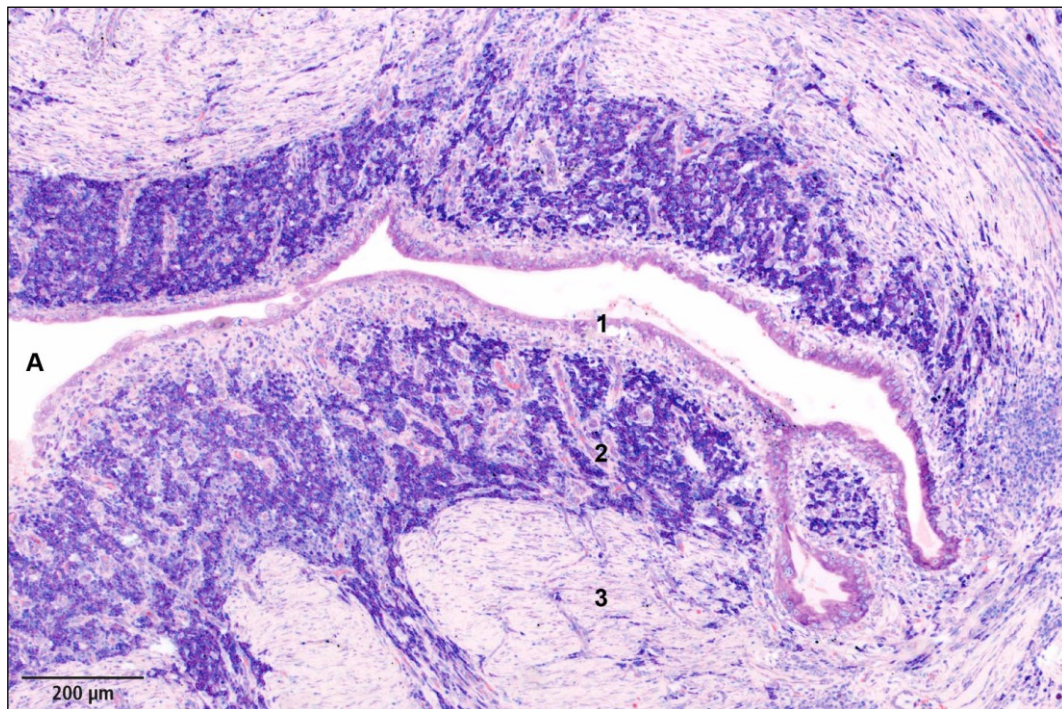


**Abb.60: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; an Lymphozyten verarmtes Lymphozyten-Aggregat; HE-Färbung**



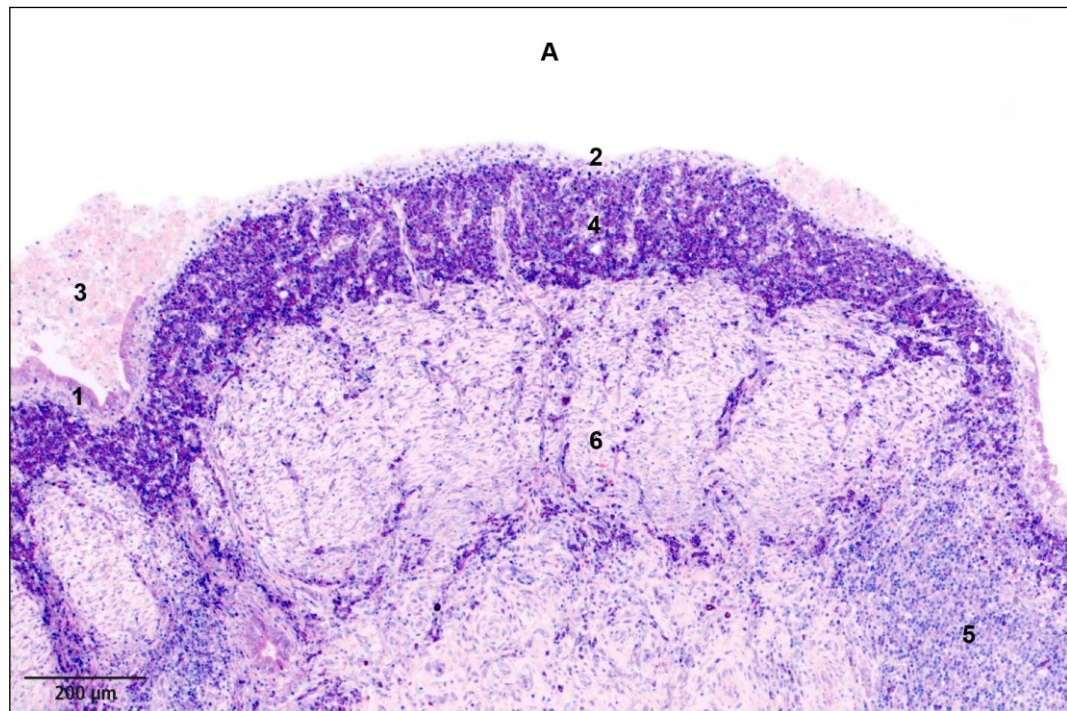
### 1.3.2.6. Plasmazellen

Plasmazellen sind, gemeinsam mit neutrophilen Granulozyten, die dominierenden Entzündungszellen bei der chronischen katarrhalisch-eitrigen Endometritis. Die Darstellung der Plasmazellen gelingt am überzeugendsten in der Giemsa-Färbung. Sie liegen überwiegend im Bereich des *Str. compactum*, entweder als umfangreichere herdförmige Ansammlungen oder als durchlaufendes Zellband (Abb.61 bis Abb.63, S.83/84), das sich zwischen das Oberflächenepithel und die Zellen des *Str. compactum* einschiebt. Unterbrochen wird das kompakte Zellband durch senkrecht an die Schleimhautoberfläche ziehende Blutgefäße (Abb.62 und Abb.63, S.84). Die typischen Plasmazellen (Abb.63) reagieren deutlich positiv mit dem Antikörper gegen CD20 und schwach positiv für CD79a (Abb.64).

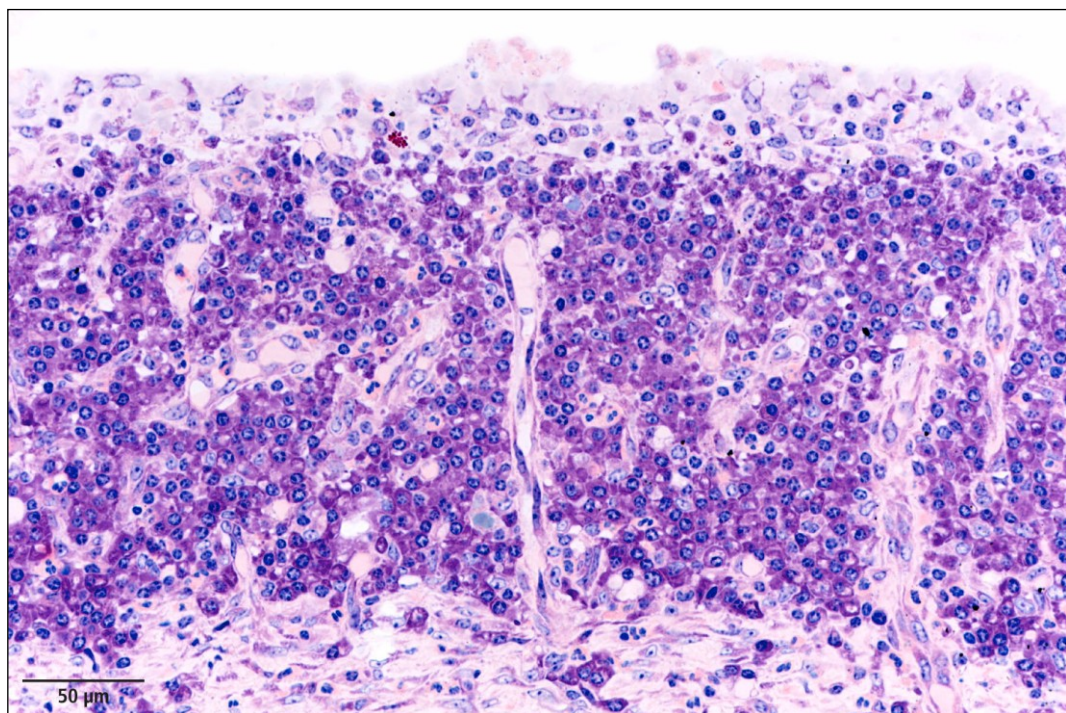


**Abb.61: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; die Plasmazellen sind in einem dichten Band angeordnet; 1: Oberflächenepithel; 2: Plasmazellen; 3: Str. compactum; A: Lumen des Uterus; Giemsa-Färbung**



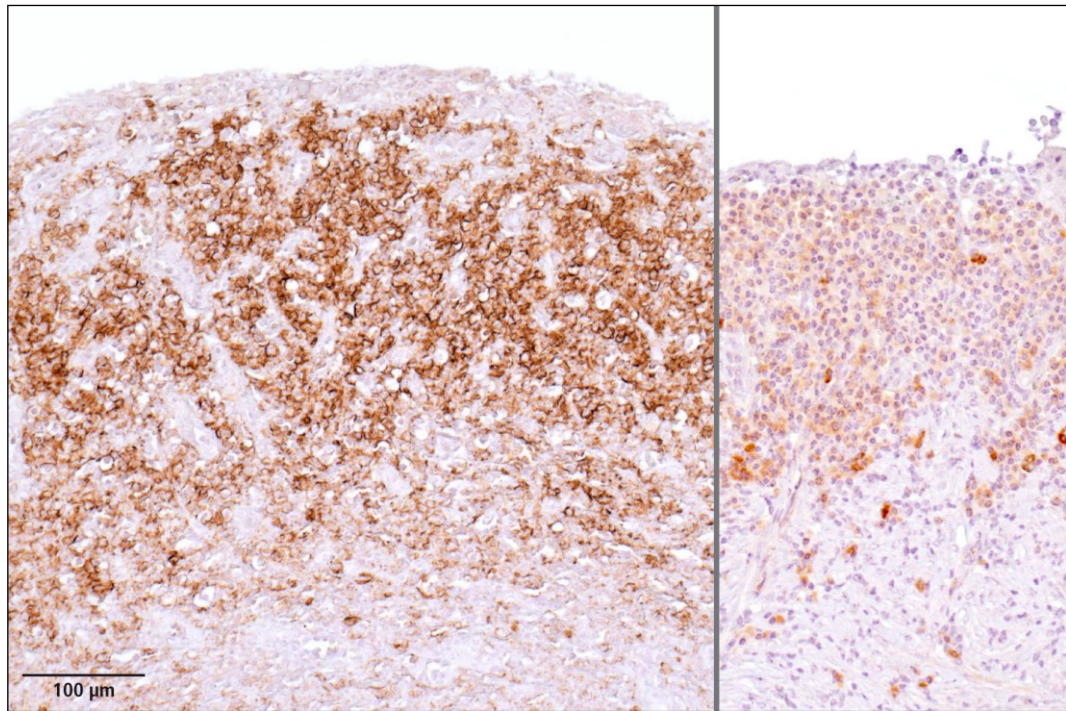


**Abb.62: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta: dichtes Band von Plasmazellen, 1: intaktes Oberflächenepithel; 2: herdförmig untergegangenes Oberflächenepithel; 3: Exsudat im Lumen; 4: Plasmazellen; 5: herdförmige Ansammlung von Lymphozyten; 6: Str. compactum; Giemsa-Färbung**



**Abb.63: Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta; typische Plasmazellen mit basophilem Zytoplasma, exzentrisch gelegenem, Heterochromatin-reichem Zellkern und juxtanukleärer Aufhellung; Giemsa-Färbung**





**Abb.64 Uterus einer Kuh mit Endometritis purulenta: immunhistochemische Darstellung von Plasmazellen / B-Lymphozyten mittels Antikörper gegen CD20 (links) und CD79a (rechts)**

Neben den Plasmazellen findet man die teils umfangreichen herdförmigen Ansammlungen von Lymphozyten. An Läsionen bilden sie, zusammen mit Lymphozyten und PMN die Grenze zwischen Lumen und dem *Str. compactum*, wobei PMN ihr Migrationsverhalten beibehalten und im Lumen zu finden sind. Das für Färsen typische subepitheliale Band von Mastzellen ist nicht mehr zu erkennen (siehe Mastzellen Kap. IV.1.2.2.1.).

## 1.4. Untersuchungen an Uteri gynäkologisch klinisch gesunder Kühe

### 1.4.1. Morphologie

Die eigentlich relevante Untersuchungsgruppe, an der die chronische, subklinische Endometritis eingeordnet werden soll, wird verglichen mit den Befunden am Endometrium von Färsen und von Kühen mit chronischer, katarrhalisch-eitriger Endometritis (Endometritis purulenta). In der histologischen Übersicht des Endometriums fällt auf, dass bei der Mehrzahl der untersuchten Kühe mit gynäkologisch klinisch gesundem Uterus eine relativ große Ähnlichkeit mit dem Endometrium der nicht tragenden Färsen besteht (Abb.65).

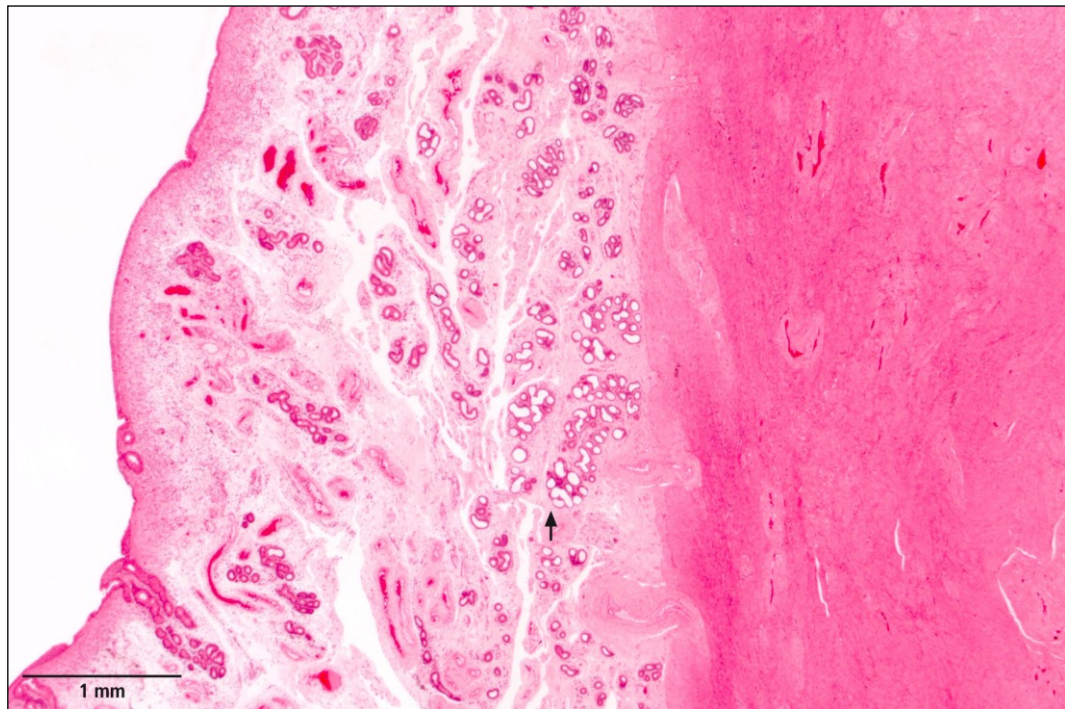


**Abb.65: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Übersicht, ein eindeutiger Unterschied gegenüber dem Endometrium von nicht tragenden Färsen ist in der Übersicht nicht zu erkennen, HE-Färbung**

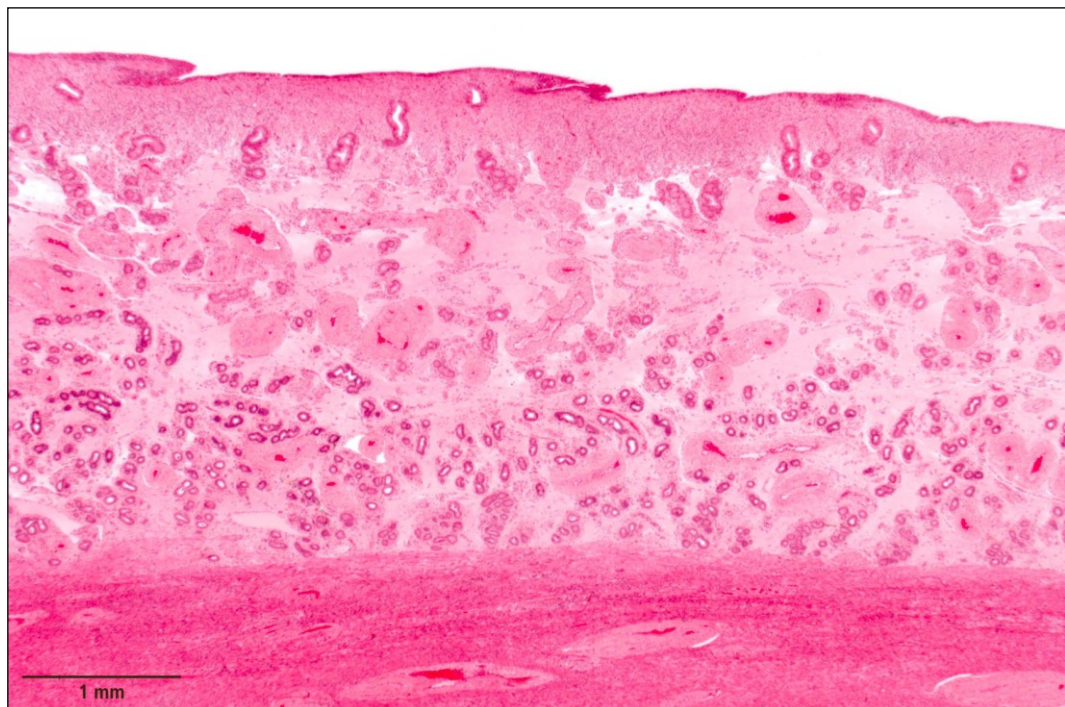
Gleichwohl gibt es Abweichungen von beiden Vergleichsgruppen sowohl auf geweblicher als auch auf zellulärer Ebene. Auf geweblicher Ebene sind die auffälligsten Besonderheiten die Tendenz zum Schwund von Uterindrüsen und die Dilatation der distalen Abschnitte der Uterindrüsen (Abb.66, S.87), die Verdichtung des *Str. compactum*, insbesondere dessen unmittelbar subepithelialer Anteil (Abb.67, S.87), sowie das häufige Vorkommen von interstitiellem Ödem (Abb.67) und die Dilatation von Lymphgefäßen. Endometrose kommt v.a. bei gynäkologisch klinisch gesunden Kühen vor, ist aber keine dominierende



## Veränderung.



**Abb.66: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Übersicht; die Anzahl der Drüsenanschnitte ist reduziert, die Lumina der distalen Drüsenanteile sind dilatiert (Pfeil): HE-Färbung**



**Abb.67: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Übersicht; hochgradige Auflockerung des Str. spongiosum bei subepithelialer Verdichtung des Str. compactum, neben dilatierten Lymphgefäßen findet sich ein ausgeprägtes interstitielles Ödem; HE-Färbung**

Bestimmende zelluläre Abweichungen bei gynäkologisch klinisch gesunden Kühen finden sich bei Plasmazellen und Lymphozyten.

Das Oberflächenepithel weicht kaum von demjenigen bei nicht tragenden Färsen ab; vereinzelt finden sich Abschnitte mit vergrößerten Zellen; eindeutige Verluste von Oberflächenepithel sind nicht zu erkennen.

#### 1.4.2. Pathologische Veränderungen

##### Fibrose

Fibrosen kommen bei gynäkologisch klinisch gesunden Tieren vermehrt und in unterschiedlichen Lokalisationen vor. Es kann entweder zu einer Zunahme von Stromazellen (Fibroblasten /-zyten) mit einer deutlichen räumlichen Ausrichtung (subepitheliale und periglanduläre Fibrose) oder zu einer ungeordneten Zunahme von Stromazellen (interstitielle Fibrose) kommen. Eine höhergradige Zunahme an Kollagenfasern liegt zumeist nicht vor.

Am häufigsten tritt die subepitheliale Fibrose auf (Abb.68), bei der ein unterschiedlich mächtiges Band (10 bis 20 Lagen von Zellen) von parallel angeordneten Fibrozyten unmittelbar unter dem Oberflächenepithel im *Str. compactum* liegt. Eingelagert in das Zellband sind Plasmazellen, Mastzellen und andere freie Zellen in geringer Menge.

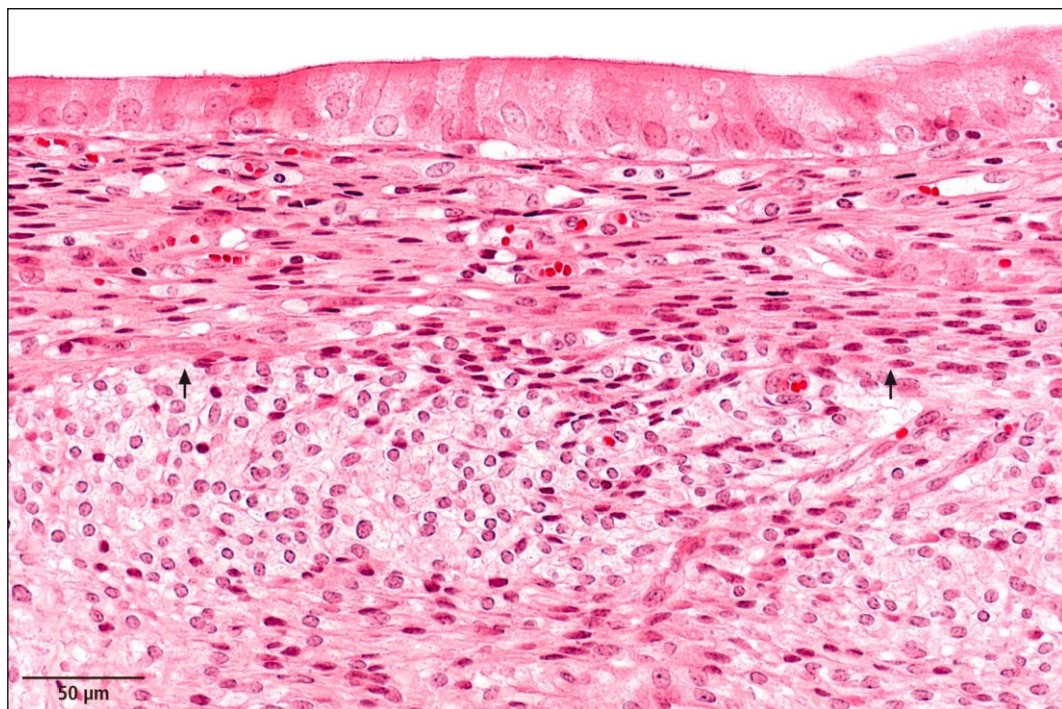
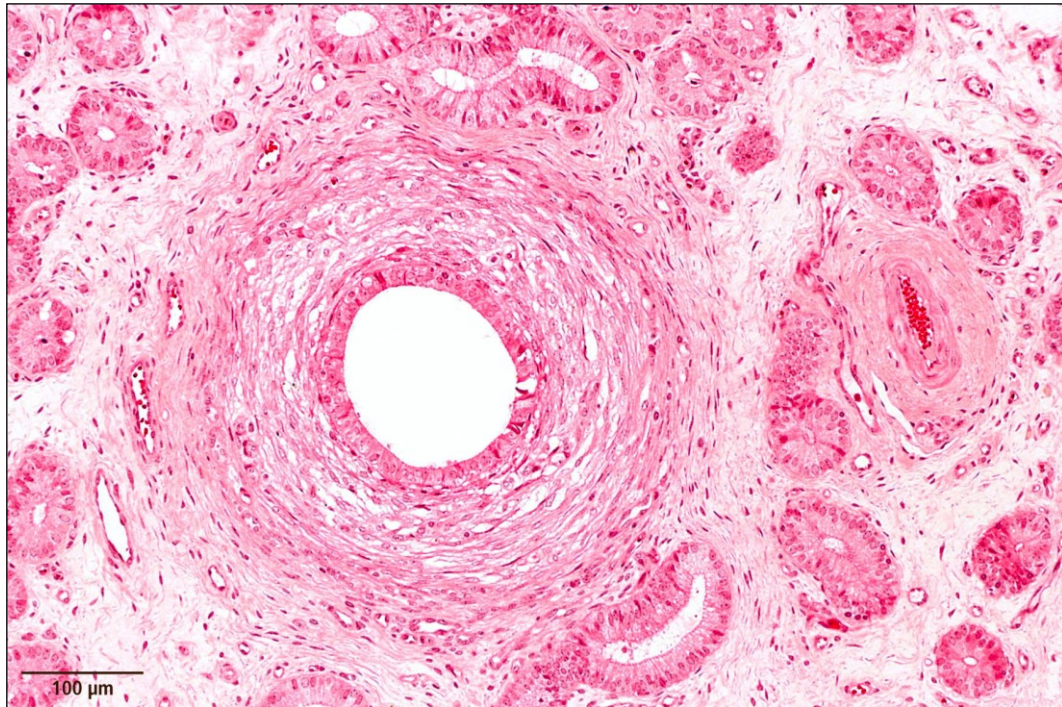


Abb.68: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; subepitheliale Fibrose aus einem Band von Stromazellen (Pfeile) bestehend, die in dichter Anordnung parallel zum Oberflächenepithel ausgerichtet sind; HE-Färbung



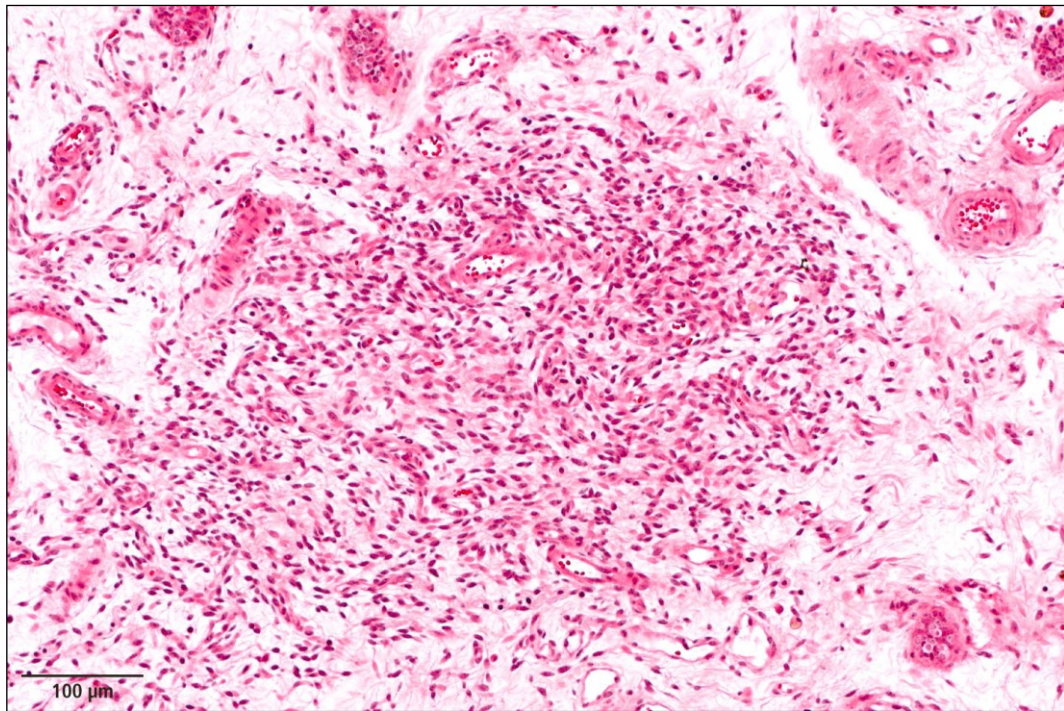
Bei einzelnen Tieren findet sich eine periglanduläre Fibrose (Abb.69), bei der Fibrozyten konzentrisch um zumeist einzelne Drüsenanschnitte herum angeordnet sind. Das Drüsenepithel selbst ist entweder unverändert oder macht einen hypertrophierten Eindruck und unterscheidet sich somit von den dilatierten Drüsenanschnitten bei der Endometrose.



**Abb.69: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; hochgradige periglanduläre Fibrose, das Drüsenepithel ist nahezu unverändert; HE-Färbung**

Eine dritte Form ist die interstitielle Fibrose (Abb.70, S.89), die durch unterschiedlich umfangreiche, ungeordnete Ansammlungen von Fibrozyten im Stroma gekennzeichnet ist. Diese Form der Fibrose darf nicht mit Anschnitten von Karunkeln verwechselt werden.

Gründe für das Auftreten der Fibrosen finden sich nicht; periglanduläre und interstitielle Fibrose gehen nicht mit einer Vermehrung an freien Zellen einher; ob die interstitielle Fibrose Folge eines interstitiellen Ödems ist, lässt sich im histologischen Schnitt nicht sicher erkennen.



**Abb.70: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, interstitielle Fibrose, herdförmige, dichte Ansammlung von Stromazellen im Str. compactum, HE-Färbung**

#### Veränderungen an Drüsen

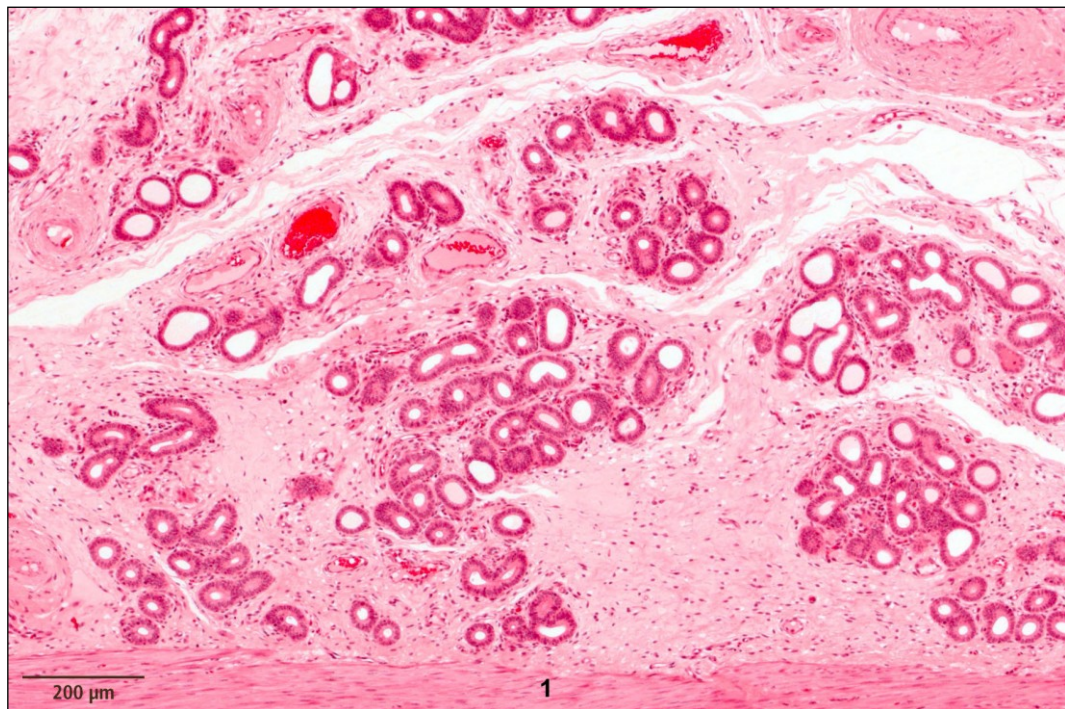
Bei allen gynäkologisch klinisch gesunden Kühen findet sich eine Dilatation der überwiegenden Zahl der distalen Anteile der Uterindrüsen (Abb.71, S.91), die bei nicht tragenden Färsen nur eine minimale Lumenbildung erkennen lassen (vgl. auch Abb.12, S.47). Weitere Veränderungen, wie periglanduläre Fibrose sind nicht zu erkennen, ob ein Zusammenhang mit der Endometrose besteht bleibt unklar.

#### Endometrose

Die Endometrose bei gynäkologisch klinisch gesunden Kühen entspricht qualitativ der bei Tieren mit Endometritis purulenta (Abb.72, S.92). Das Lumen der Drüsen ist erheblich erweitert, die Form der Anschnitte weicht von der typischen Kreisform ab, das Drüsenepithel ist hochgradig abgeflacht und vermehrt basophil. Die unregelmäßige Form der Drüsenanschnitte könnte auf eine Fusion von Drüsen oder aber auch auf eine Proliferation des Drüsenepithels hinweisen. Die Drüsen sind von einer mäßigen periglandulären Fibrose umgeben; freie Entzündungszellen sind nicht eindeutig vermehrt. Daneben finden sich, ähnlich wie bei der Endometritis purulenta, Drüsenanschnitte, deren Durchmesser hochgradig verkleinert ist (Abb.73, S.92). Häufigkeit und Ausmaß der

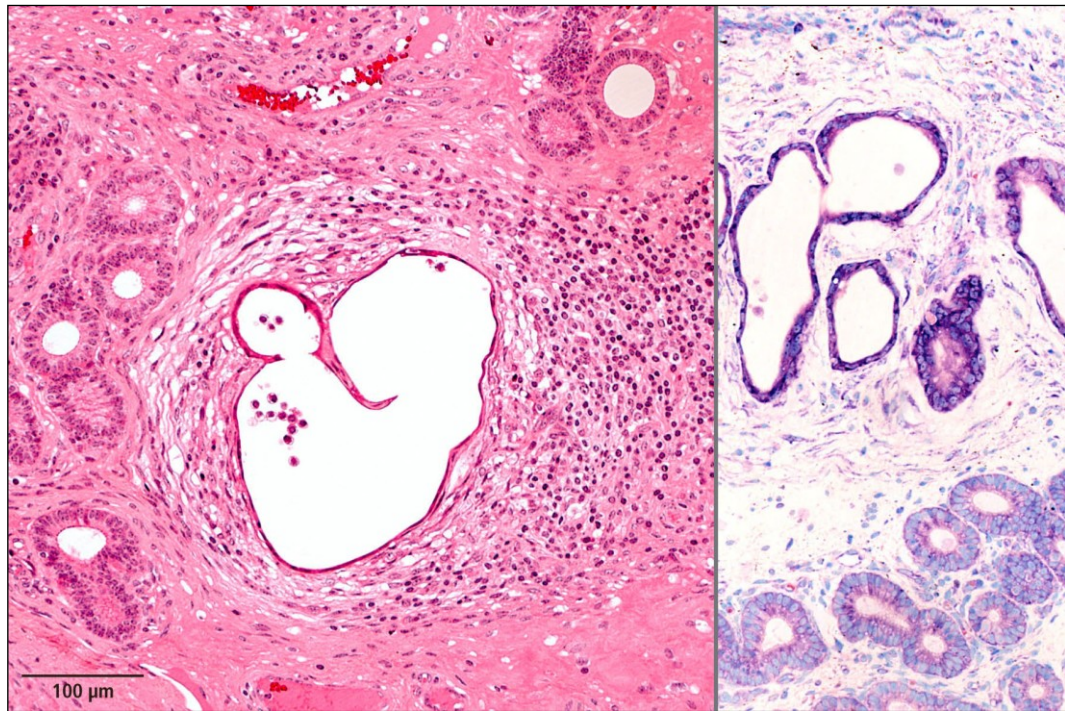


Endometrose sind bei gynäkologisch klinisch gesunden Kühen geringer im Vergleich zur Endometritis purulenta.

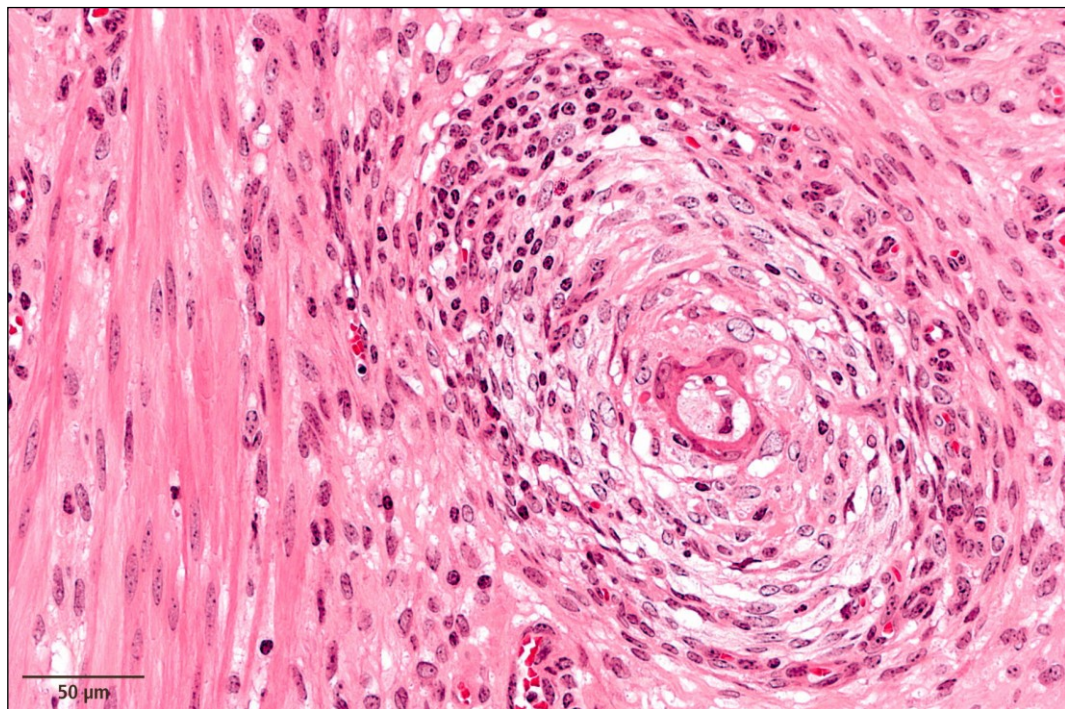


**Abb.71: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; Uterindrüsen; Dilatation der distalen Anteile der Drüsen; eine eindeutige periglanduläre Fibrose liegt nicht vor; 1: Myometrium; HE-Färbung**





**Abb.72:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; HE-Färbung (links) Endometrose, die veränderten Drüsen sind dilatiert, ihre Form vielgestaltig, das Drüsenepithel hochgradig abgeflacht und von einer periglandulären Fibrose umgeben; die Giemsa-Färbung (rechts) zeigt die deutliche Basophilie des Drüsenepithels



**Abb.73:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; Endometrose, deutliche Verkleinerung des Drüsendurchmessers bei hochgradiger periglandulärer Fibrose, in der Peripherie herdförmige Ansammlung von Lymphozyten; HE-Färbung



### 1.4.3. Freie Zellen im Endometrium

#### 1.4.3.1. Mastzellen

Die Mastzellen sind vor allem in Form eines subepithelialen Bandes angeordnet, daneben finden sich einzelne Mastzellen in allen Anteilen des Endometriums. Es gibt in der Verteilung somit keine Abweichungen von den nicht tragenden Färsen.

#### 1.4.3.2. Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten treten bei einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh in größerer Menge auf, in einem Ausmaß, das den Gehalt an diesen Zellen bei nicht tragenden Färsen überschreitet, aber an den bei der Endometritis purulenta nicht heranreicht (Abb.74, S.93). Bei den übrigen Tieren finden sich neutrophile Granulozyten in ähnlicher Menge wie bei Färsen, also vereinzelt Zellen im *Str. compactum* oder vereinzelt auswandernd im Oberflächenepithel (Abb.75, S.94). Auch die selektive Darstellung von neutrophilen Granulozyten mittels der Chlorazetat-Esterase-Reaktion lässt ein umfangreicheres Infiltrat nicht erkennen. Somit entspricht die Menge an neutrophilen Granulozyten eher der bei nicht tragenden Färsen als bei Kühen mit Endometritis purulenta.

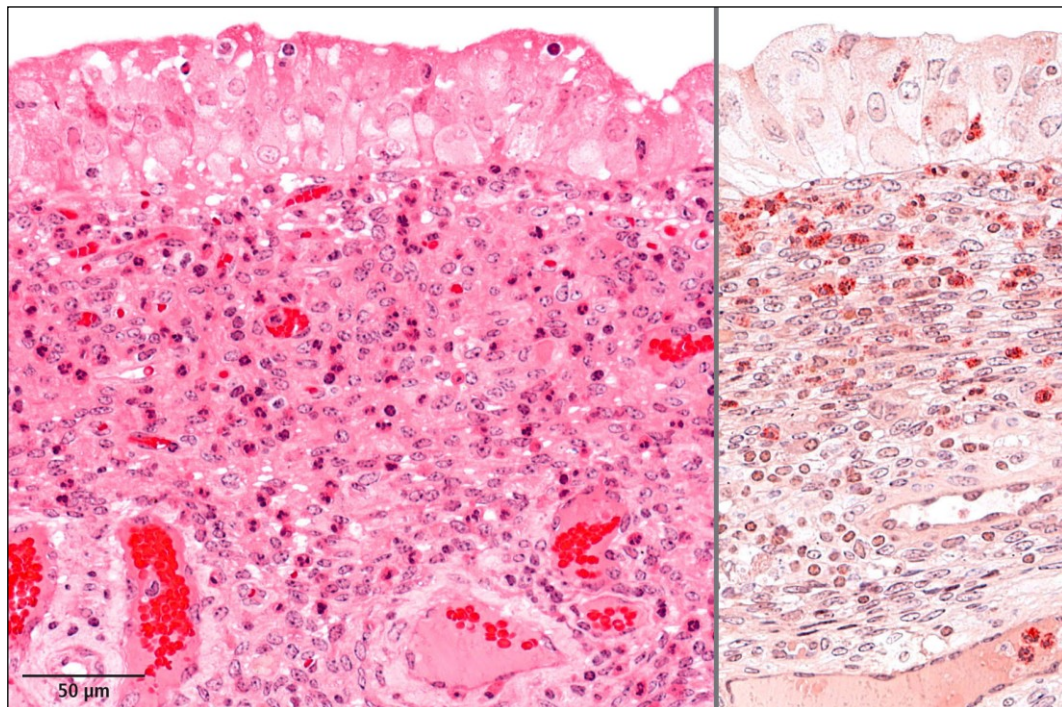
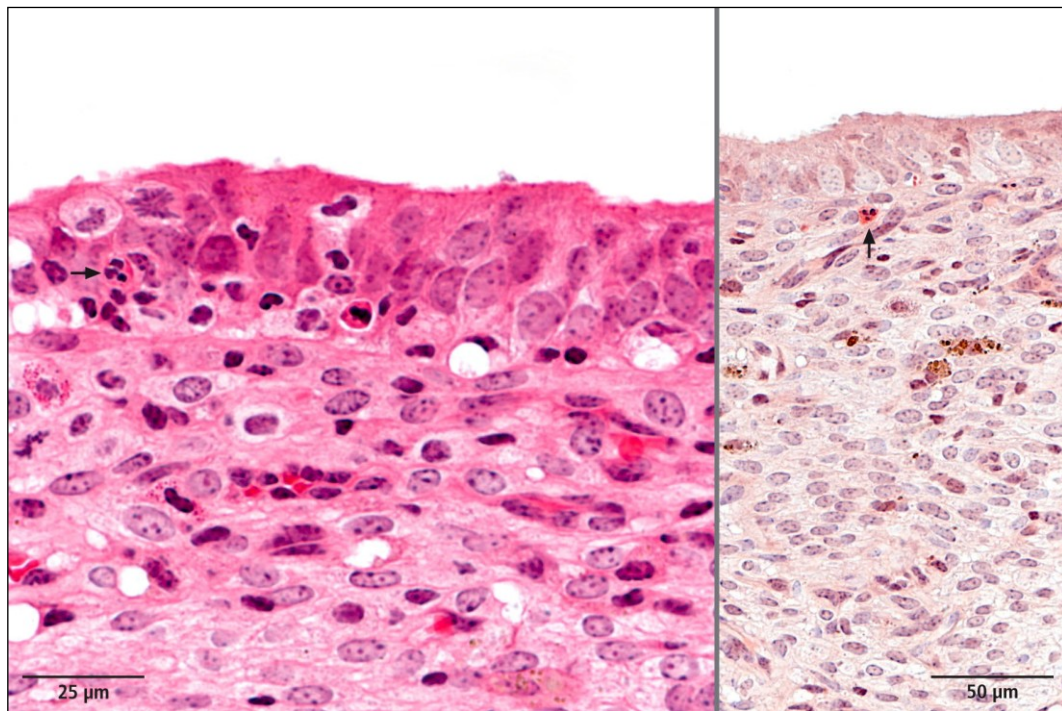


Abb.74: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; HE-Färbung (links): neutrophile Granulozyten, einzelnes Tier mit einer deutlichen Vermehrung der Neutrophilen im *Str. compactum* und in der Phase des Auswanderns ins Uteruslumen; rechts: Chlorazetat-Esterase-Reaktion



**Abb.75:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, HE-Färbung (links): neutrophile Granulozyten, üblicherweise finden sich nur vereinzelte neutrophile Granulozyten (Pfeil); Chlorazetat-Esterase-Reaktion (rechts)

#### 1.4.3.3. Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten kommen in ähnlicher Menge und Verteilung wie bei nicht tragenden Färsen vor.

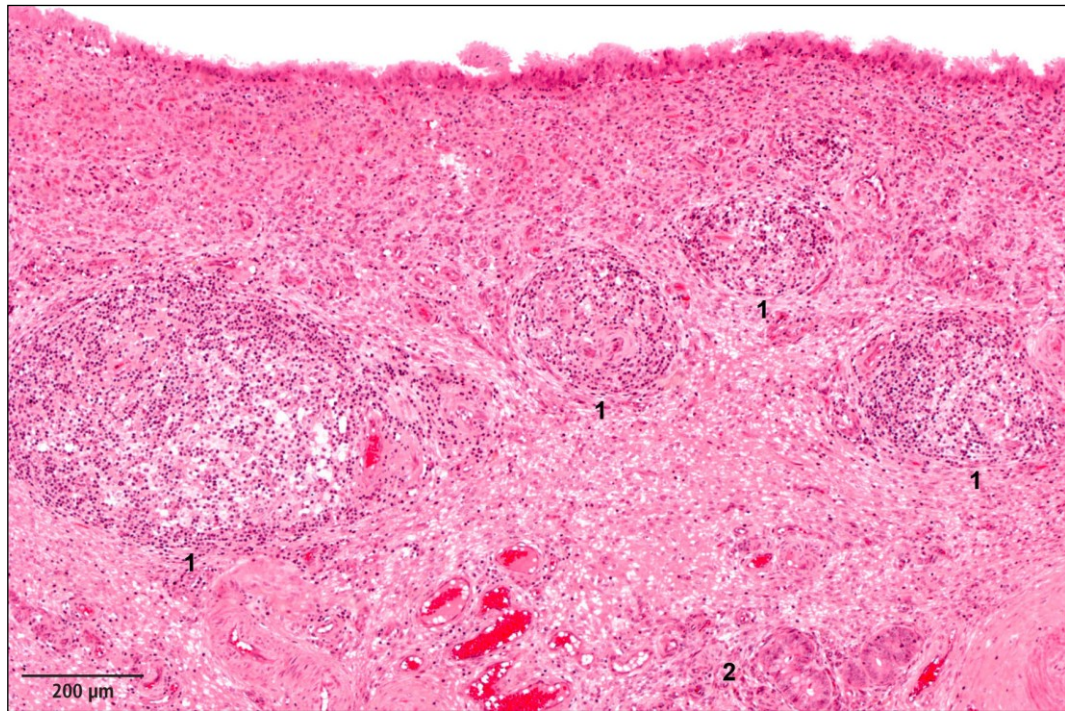
#### 1.4.3.4. Makrophagen

Makrophagen treten vor allem in Form von Pigmentmakrophagen in Erscheinung; es besteht der Eindruck einer Vermehrung dieser Zellen im Vergleich zu den nicht tragenden Färsen.

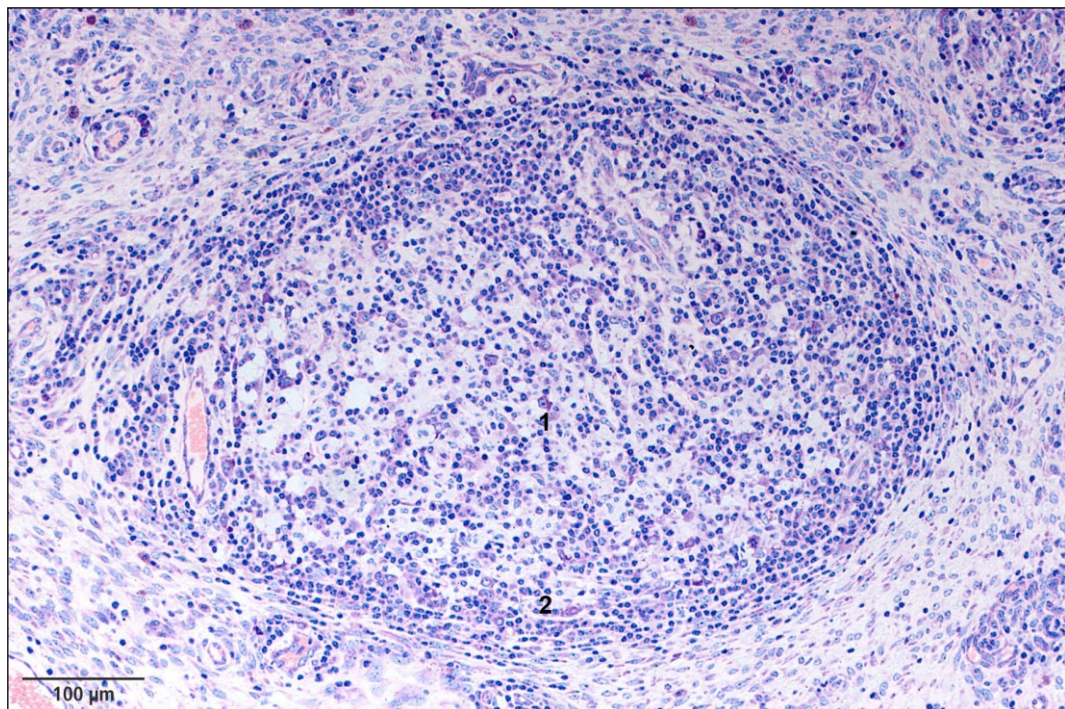
#### 1.4.3.5. Lymphozyten

Neben kleinherdigen, vor allem perivaskulär gelegenen Ansammlungen von Lymphozyten, kommen bei gynäkologisch klinisch gesunden Kühen regelmäßig und in größerer Anzahl Lymphozyten-Aggregate im Endometrium vor (Abb.76). Im Vergleich mit dem Bild bei nicht tragenden Färsen sind die Aggregate deutlich zellreicher (Abb.77, S.95); eine Lymphozyten-Verarmung, wie man sie in den Aggregaten bei Kühen mit Endometritis purulenta findet, ist nicht zu beobachten. Ein Teil der Aggregate weist morphologische Kennzeichen von Sekundärfollikeln mit hellem Keimzentrum und einer dunkleren Mantelzone auf (Abb.77, S.95).



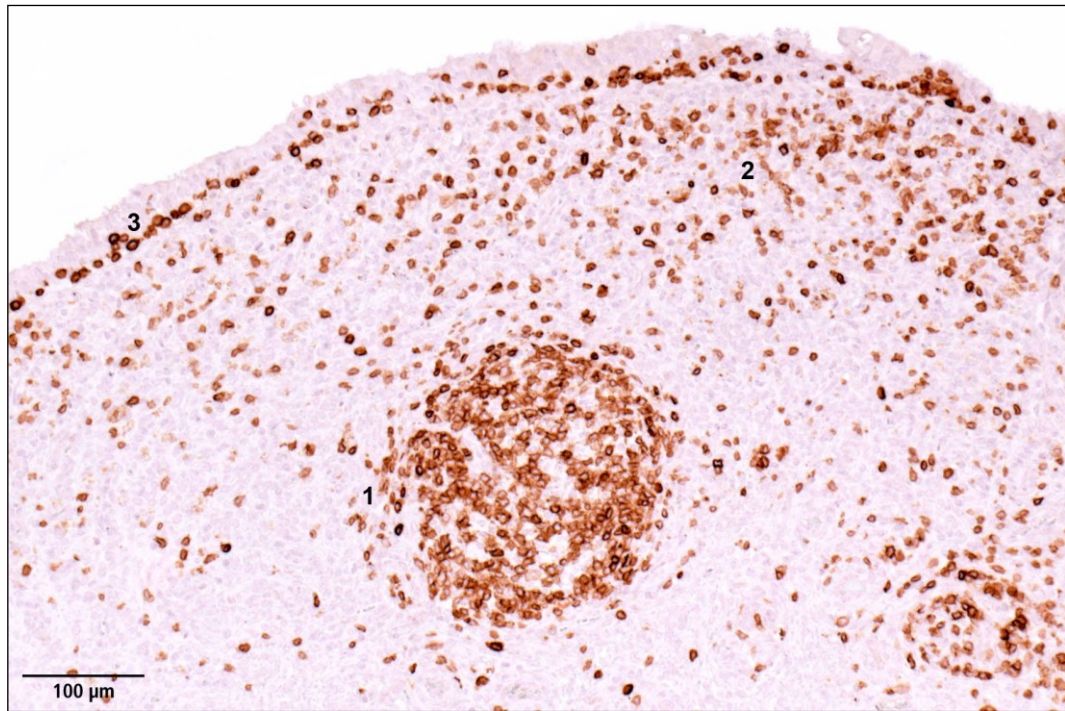


**Abb.76: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Lymphozyten, mehrere Lymphozyten-Aggregate im Stroma (1), die Uterindrüsen (2) sind weitgehend verdrängt; HE-Färbung**



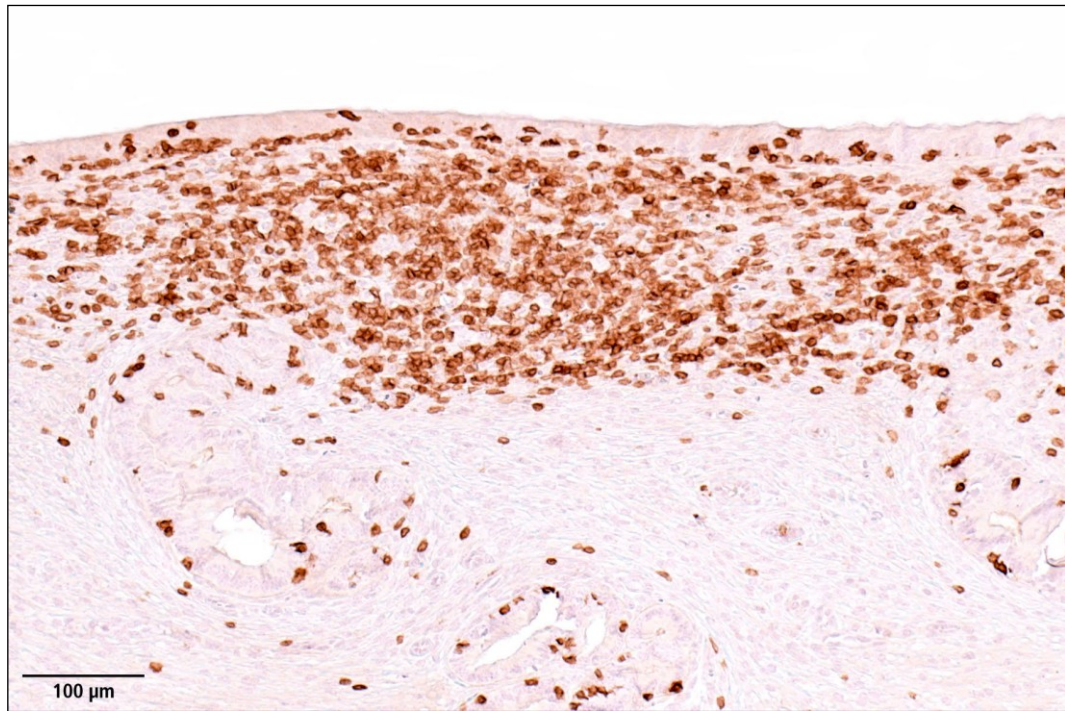
**Abb.77: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; Lymphozyten; Ansammlung von Lymphozyten in Form eines Sekundärfollikels mit hellem Keimzentrum (1) und dunkler Mantelzone (2), Giemsa-Färbung**



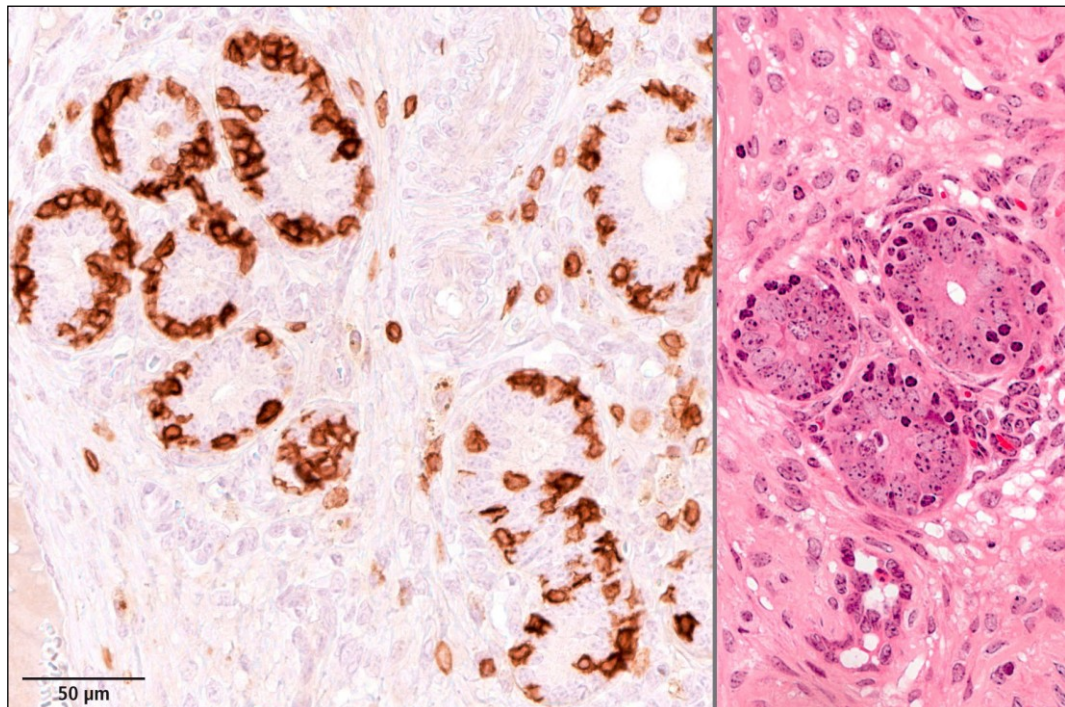


**Abb.78:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh; T-Lymphozyten, herdförmige Ansammlung von Lymphozyten (1), daneben locker eingestreut in das Str. compactum (2) und intraepithelial im Oberflächenepithel (3); Immunhistochemie anti CD3

T-Lymphozyten, immunhistochemisch nachgewiesen durch ihre positive Reaktion mit dem Antikörper gegen CD3, finden sich in Form der kleinherdigen Ansammlungen im *Str. compactum* (Abb.78, S.96). Neben den rundlichen Herden kommen teils mächtige bandförmige Ansammlungen von T-Lymphozyten unmittelbar subepithelial vor (Abb.79). Ähnlich wie die hier häufig anzutreffenden Plasmazellen sind diese Zellen in der HE-Färbung nicht sicher zu identifizieren und von den Stromazellen abzugrenzen. Auffällig ist ferner die Zunahme von intraepithelialen T-Lymphozyten in den dilatierten distalen Drüsenabschnitten bei gynäkologisch klinisch gesunden Kühen (Abb.80, S.97).



**Abb.79:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, T-Lymphozyten, dichtes subepitheliales Band; Immunhistochemie anti CD3



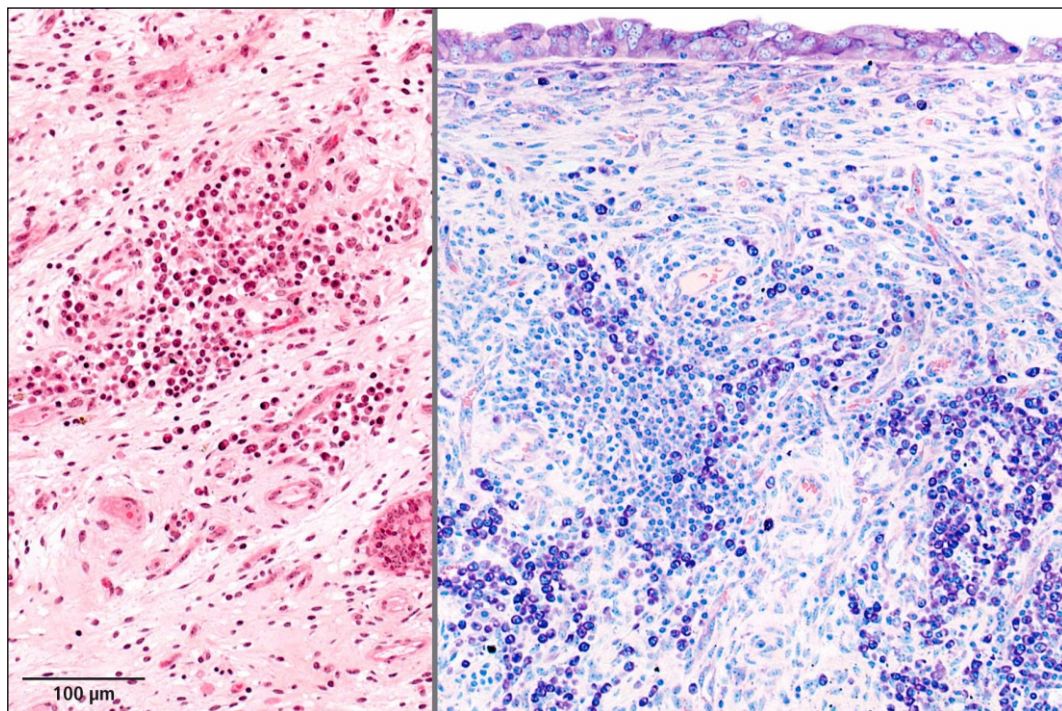
**Abb.80:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, T-Lymphozyten, intraepitheliale Lymphozyten in den distalen Anschnitten von Uterindrüsen; Immunhistochemie anti CD3 (links), HE-Färbung (rechts)



#### 1.4.3.6. Plasmazellen

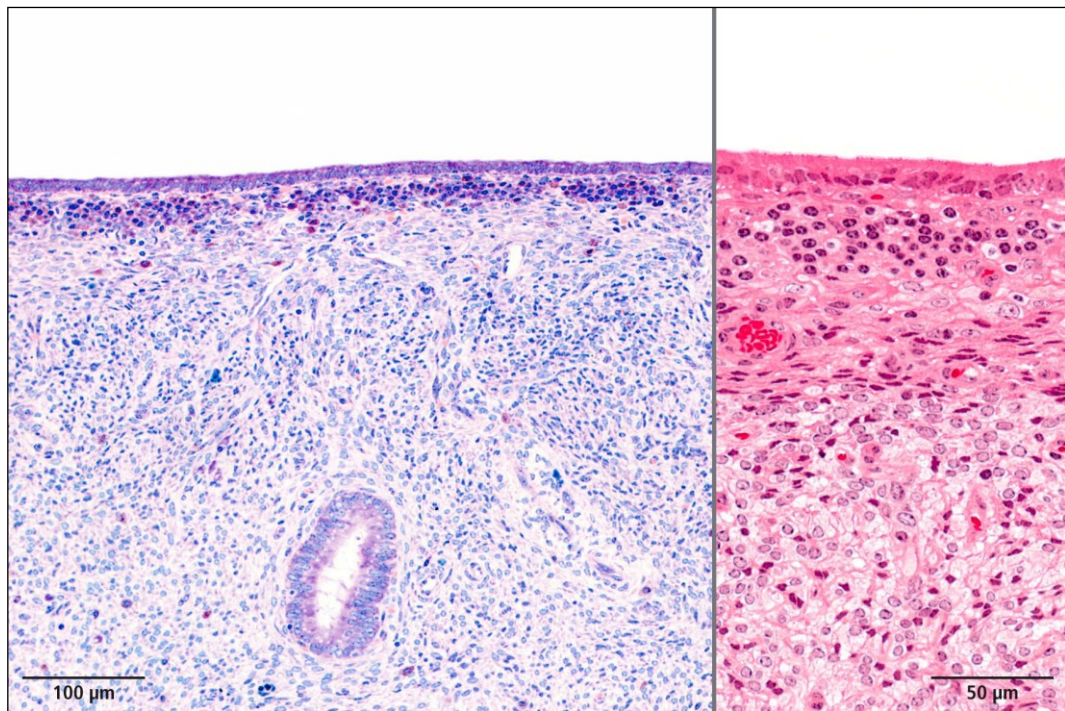
Plasmazellen kommen bei den Kühen dieser Gruppe deutlich vermehrt im Vergleich mit den Färsen vor, wenn auch nicht in einer so großen Anzahl wie bei den Tieren mit Endometritis purulenta. Menge und Verteilungsmuster dieser chronischen Entzündungszellen variieren. Einerseits gibt es lockere, vor allem perivaskuläre Ansammlungen von Plasmazellen in den oberen Anteilen des Endometriums (Abb.81).

Häufiger allerdings liegen die Plasmazellen als unterschiedlich mächtiges Band unter dem Oberflächenepithel. Während sie in der Giemsa-Färbung sicher zu identifizieren sind, selbst wenn sie nur in geringer Menge vorkommen, ist ihr Auffinden in geringmächtigen Bändern in der HE-Färbung nahezu unmöglich (Abb.82, S.99). Die Plasmazellen sind dann häufig spindelförmig und liegen zwischen den parallel zur Oberfläche angeordneten, ebenfalls spindelförmigen Stromazellen. Umfangreichere Ansammlungen von Plasmazellen sind hingegen gut zu erkennen (Abb.83, S.99).

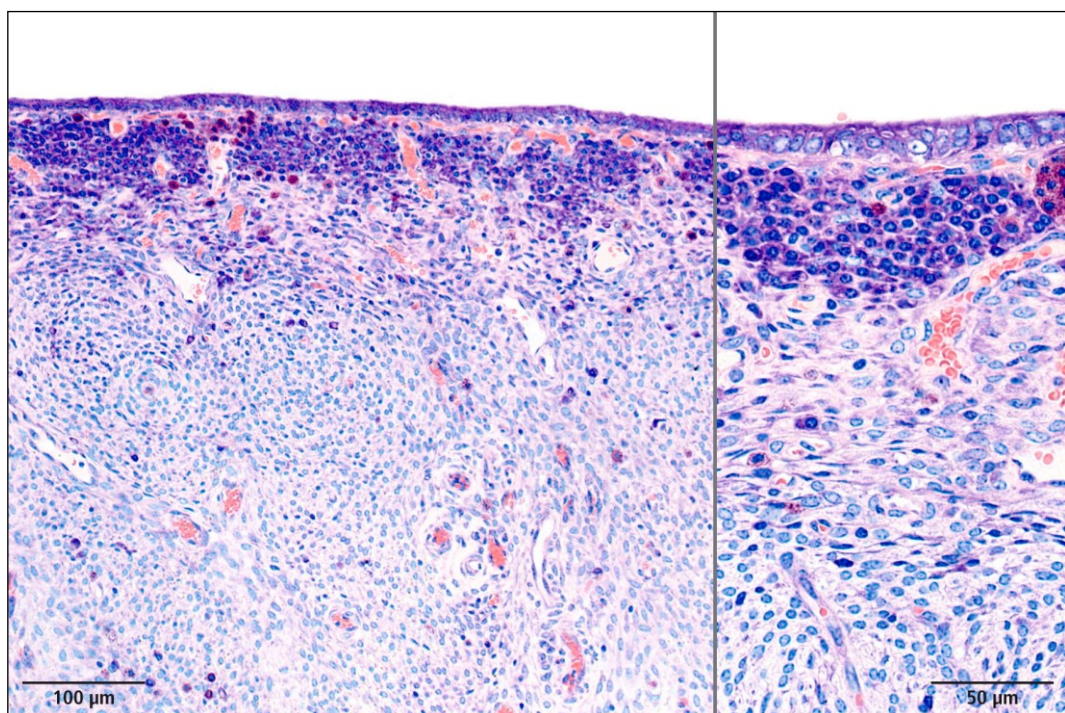


**Abb.81: Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Plasmazellen, herdförmige Ansammlungen von Plasmazellen, die bereits in der HE-Färbung (links) gut zu identifizieren sind, neben den Plasmazellen finden sich in der Giemsa-Färbung (rechts) umfangreichere Ansammlungen von Lymphozyten**





**Abb.82:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Plasmazellen, schmales Band von Plasmazellen unmittelbar unter dem Oberflächenepithel, deutlich zu erkennen in der Giemsa-Färbung (links); in der HE-Färbung (rechts) sind die Plasmazellen nicht sicher zu erkennen



**Abb.83:** Uterus einer gynäkologisch klinisch gesunden Kuh, Plasmazellen, (links): umfangreicheres Band von Plasmazellen unter dem Oberflächenepithel, untermischt mit Mastzellen; (rechts): Detailansicht

### 1.5. Semiquantitative Auswertung der histologischen Schnitte aller Gruppen

Anhand eines Protokolls (Anhang IX.1.8., S.166) wurde, unabhängig von der qualitativen Histologie, eine semiquantitative Auswertung an 45 Merkmalen durchgeführt. Am Epithel wurden die Merkmale Epithelhöhe, neutrophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Lymphozyten berücksichtigt, im Interstitium alle in Tab.7 und Tab.8 (S.104 und S.105) aufgeführten morphologischen und zellulären Merkmale. Die Abb.84 zeigt eine schematische Darstellung zur Merkmalerhebung im Endometrium. Mit 12 Uteri in Gruppe 1 „nicht tragenden Färsen“, 10 Uteri in Gruppe 2 „Endometritis purulenta“ und 14 Uteri in Gruppe 3 „gynäkologisch klinisch gesunde Kühe“ gelangten bei 12 befundeten Lokalisationen je Uterus (vgl. Abb.1, S.21, Lokalisationen der Hörner) maximal 144 (Gruppe 1), 120 (Gruppe 2) und 168 (Gruppe 3) Einzelbefunde zur prozentualen Auswertung (Chi-Quadrat-Test).

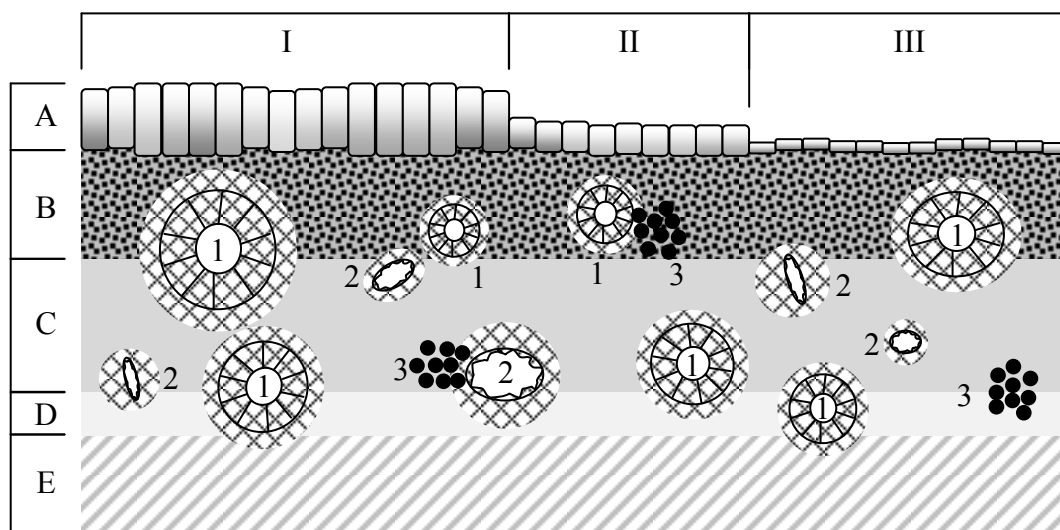


Abb.84: Schematische Darstellung des Endometriums zur Veranschaulichung der semiquantitativen Auswertung, A: Epithel B: Stratum compactum, hohes Segment der Lymphspalten, C: mittleres Segment der Lymphspalten; D: tiefes Segment der Lymphspalten; E: Myometrium; 1: Drüsenanschnitt, schraffierte Fläche: drüsenassoziierter Bereich; 2: Gefäßanschnitt schraffierte Fläche: gefäßassoziierter Bereich; 3: Merkmal herdförmig in den berücksichtigten Ausprägungen, Schraffierung 1 und 2 = Einzugsbereich für das Merkmal Drüsen und das Merkmal Gefäß; I: hochprismatisches Endometrium; II: isoprismatisches Endometrium; III: plattes Endometrium;

Beim paarweisen Gruppenvergleich wurden bei 15 von 45 berücksichtigten Merkmalen keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,05$ ) (Tab.8, S.105) ermittelt. Signifikante ( $p < 0,05$ ) bzw. hochsignifikante Unterschiede ( $p \leq 0,001$ ) konnten bei 19 Merkmalen für mindestens einen Gruppenvergleich (Tab.7, S.104) bzw. bei 11 Merkmalen für jeden der 2 möglichen Vergleiche (Tab.7, S.104) festgestellt

werden.

#### Endothel

Am Epithel wurden die Höhe des Endometriums und Läsionen berücksichtigt. Hochprismatische Zellen sind in Gruppe 2 mit 40% der Lokalisationen gegenüber Gruppe 1 und 3 (91% bzw. 79%) weniger ( $p < 0,001$ ) zu finden. Isoprismatische Zellen sind in allen Gruppen zu finden, wobei sich ausschließlich Gruppe 1 gegenüber Gruppe 2 signifikant unterscheidet. Abgeflachte Zellen sind bei Gruppe 2 signifikant unterschiedlich häufiger zu finden ( $p < 0,001$ ). Das Vorkommen von Läsionen ist mit 61% in Gruppe 2 signifikant unterschiedlich ( $p < 0,001$ ) zur Gruppe 1 (2%) und Gruppe 3 (4%).

#### Dilatierte Drüsen

Deutlich dilatierte Drüsenabschnitte kommen in allen drei Gruppen vor. In Gruppe 1 sind sie in 8% der Lokalisationen, in Gruppe 2 in 77% und in Gruppe 3 in 40% zu finden (signifikant unterschiedlich  $p \leq 0,001$  in allen Vergleichen). In Gruppe 1 war das Epithel der Drüsen in diesen Arealen ausschließlich isoprismatisch. In Gruppe 2 war es in 64% der Lokalisationen flach. In Gruppe 3 konnte hochprismatisches (15%) und isoprismatisches (48%) Drüsenepithel beobachtet werden.

#### Lymphspalten und Ödematisierung

Neben dem Vorkommen von Lymphspalten wurde auch die Lokalisation von Lymphspalten in drei Merkmalen, dem Vorkommen von Lymphspalten im *Str. compactum* (Abb.84, S.100, B), darunter (Abb.84, C) und direkt am Myometrium (Abb.84, D), berücksichtigt. Mit 9% der Lokalisationen sind Lymphspalten bei Gruppe 2 „Klinische Endometritis und Endometritis purulenta“ selten zu finden. Bei Gruppe 1 und 3 kommen sie in 81% und 80% der Lokalisationen ähnlich häufig vor ( $p \geq 0,05$ ), gegenüber Gruppe 2 unterscheiden sich beide signifikant ( $p < 0,001$ ). In Gruppe 1 und 3 kommen Lymphspalten im Segment C (unter dem *Str. compactum*) am häufigsten vor. In diesen Gruppen sind Lymphspalten in den höher und tiefer gelegenen Segmenten mit über 82% am häufigsten zu finden. Ödematisierung ist in Gruppe 1 in 30%, in Gruppe 2 in 73% und in Gruppe 3 in 13% der Lokalisationen zu finden.

#### Zellen im Lumen

Zellen auf der Lumenseite des Endometriums und im Lumen der



Drüsenanschnitte sind bei nicht tragenden Färsen (Grp. 1) nicht zu finden. Gegenüber dieser Gruppe kommen im Uteruslumen Zellen bei Gruppe 2 in 76% ( $p<0,001$ ) und bei Gruppe 3 in 8% ( $p=0,017$ ) der Lokalisationen vor. Im Drüsenlumen konnten Zellen in 66% der Lokalisationen bei Gruppe 2 und in 7% bei Gruppe 3 ( $p=0,03$ ). beobachtet werden.

#### Mastzellen

Mastzellen sind subepithelial am häufigsten bei nicht tragenden Färsen zu finden. Gruppe 1 unterscheidet sich hierbei signifikant von Gruppe 2 und 3 ( $p<0,001$ ). Gruppe 2 und 3 unterscheiden sich nicht signifikant. Im Interstitium kommen Mastzellen mit 90% Prozent in allen drei Gruppen ausschließlich diffus vor.

#### Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten kommen in jeweils 96% der Lokalisationen in den Merkmalen „intra-„ und „subepithelial“ am häufigsten bei Gruppe 2 vor ( $p>0,001$  vs. Grp. 1 und 3). Gruppe 1 und 3 unterscheiden sich im Merkmal „intra-“ und „subepithelial“ signifikant. Dabei finden sich PMN nach diesen Merkmalen in 7% der Lokalisationen bei Gruppe 3, wodurch sie sich signifikant gegenüber Gruppe 1 mit maximal 1% unterscheidet ( $p=0,03$ ).

In den weiteren Merkmalen (neutrophile Granulozyten im Interstitium, drüsenassoziiert, gefäßassoziiert) sind neutrophile Granulozyten mit höchstens 2% (Grp. 1), 100% in Gruppe 2 und mit 17% in Gruppe 3 der Lokalisationen zu finden. In Gruppe 2 sind in 91% der Lokalisationen PMN im Merkmal drüsenassoziiert Bereich zu finden, in den beiden anderen Gruppen nie. Für alle Gruppen gilt, dass PMN in keiner Lokalisation in herdförmiger Ansammlung zu finden sind.

#### Eosinophile Granulozyten

Eosinophile Granulozyten kommen ganz überwiegend diffus verteilt vor. Hier konnten hochsignifikante Unterschiede der Gruppen 1 und 3 zu Gruppe 2 errechnet werden. Mit 18% der Lokalisationen in Gruppe 1, mit 71% in Gruppe 2 und mit 7% in Gruppe 1 ( $p<0,001$  Vergleich aller Gruppen) kommen sie in allen drei Gruppen vor. In den gefäß- bzw. drüsenassoziierten Bereichen kommen sie nur vereinzelt (5%) in Gruppe 2 vor.

#### Siderophagen (=Pigmentmakrophagen)

Siderophagen sind im Interstitium in allen Gruppen analog zu den Beobachtungen

bei den eosinophilen Granulozyten ganz überwiegend diffus verteilt zu finden. Am häufigsten auch hier in Gruppe 2 mit 83%, bei Gruppe 1 mit 2% und bei Gruppe 3 mit 29%. Alle Gruppen unterscheiden sich signifikant ( $p < 0,001$ ). Vereinzelt treten sie in Gruppe 2 bei 8% der Lokalisation herdförmig auf (Grp.1 vs. Grp.2 und Grp.2 vs. Grp.3,  $p = 0,017$ ).

### Lymphozyten

Am Epithel kommen Lymphozyten in allen drei Gruppen intra-, und „subepithelial“ in über 90% der Lokalisationen vor. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant.

Im Interstitium können Lymphozyten vor allem in Gruppe 2 stets diffus verteilt und drüsenassoziiert (beide Merkmale 100%) als auch gefäßassoziiert (75%) beobachtet werden. Gruppe 1 und 3 treten vorwiegend diffus verteilt (100% bzw. 97%), in geringerem Umfang auch drüsenassoziiert (13% bzw. 28%), jedoch nie gefäßassoziiert auf. Herdförmige Anordnungen konnten nur in Gruppe 3 vereinzelt festgestellt werden.

Lymphozytenansammlungen kommen in allen drei Gruppen vor. Ihr Vorkommen ist in der Gruppe 2 mit 27% am häufigsten (Grp. 1 und 3 2% bzw. 11%) und unterscheidet sich für alle Gruppenvergleiche signifikant. Ansammlungen, die wie Lymphfollikel organisiert sind, kommen mit maximal 3% in allen drei Gruppen vor.

### Plasmazellen

Plasmazellen wurden im Interstitium berücksichtigt. Hier kommen sie diffus verteilt in den drei Gruppen in über 84% der Lokalisationen vor. Gruppe 2 unterscheidet sich mit 95% hierbei signifikant von Gruppe 1 (84%,  $p < 0,01$ ). Nur Gruppe 2 weist neben der diffusen Verteilung vereinzelt auch gefäß- und drüsenassoziierte Beobachtungen auf. Statistisch signifikante Unterschiede finden sich vor allem im Merkmal „herdförmige Anordnung“. Hier sind in Gruppe 2 in 25% der Lokalisationen Plasmazellen aufzufinden, während sie in der Gruppe der Färsen nicht und in Gruppe 3 nur in 4% der Lokalisationen beobachtet werden konnten.

Die Übersichtstabellen 7 und 8 zeigen die Ergebnisse der semiquantitativen Auswertung für alle untersuchten Merkmale. Die Übersichten gliedern sich in Merkmale, bei denen für mindestens einen (Tab.7, S.104) oder keinen (Tab.8,

S.105) der drei möglichen paarweisen Gruppenvergleiche signifikante Unterschiede ermittelt wurden.

**Tab.7: Übersicht der semiquantitativen Auswertung von Merkmalen, für die mindestens ein Gruppenvergleich signifikant unterschiedlich ist.**

	Gruppe 1 gegen Gruppe 2	Gruppe 1 gegen Gruppe 3	Gruppe 2 gegen Gruppe 3
Dilatierte Drüsen im Interstitium	↓↓	↓↓	↑↑
Dilatierte Drüsen im Interstitium, Epithelhöhe flach	↓↓	n.s.	↑↑
Dilatierte Drüsen im Interstitium, Epithelhöhe hochprismatisch	↓↓	↓	n.s.
Dilatierte Drüsen im Interstitium, Epithelhöhe isoprismatisch	↑↑	↑↑	↓↓
Drüsenassoziierte Lymphozyten	↓↓	↓↓	↓
Drüsenassoziierte neutrophile Granulozyten	↓↓	n.s.	↑↑
Drüsenassoziierte Plasmazellen	n.s.	↑↑	n.s.
Eosinophile Granulozyten/diffus verteilt	↓↓	↑	↑↑
Epithelhöhe flach	↓↓	n.s.	↑↑
Epithelhöhe hochprismatisch	↑↑	n.s.	↓↓
Epithelhöhe isoprismatisch	↓↓	n.s.	↑
Gefäßassoziierte Lymphozyten	↓↓	n.s.	↓↓
Gefäßassoziierte neutrophile Granulozyten	↓↓	n.s.	↑↑
keine Lymphspalten	↑↑	n.s.	↓↓
Läsionen am Epithel	↓↓	n.s.	↑↑
Lymphozyten intraepithelial	n.s.	↑	n.s.
Lymphozytenansammlung	↓↓	↓	↑
Lymphspalt Segment B	↑	n.s.	↓
Lymphspalt Segment C	↑↑	n.s.	↓
Lymphspalt Segment D	n.s.	↓↓	↓↓
Mastzellen intraepithelial	↓	n.s.	↑
Mastzellen subepithelial	↑↑	↑↑	n.s.
Neutrophile Granulozyten am Epithel, intraepithelial	↓↓	↓	↑↑
Neutrophile Granulozyten am Epithel, subepithelial	↓↓	n.s.	↑↑
Neutrophile Granulozyten/diffus verteilt	↓↓	↓↓	↑↑
Ödematisierung	↓↓	↑	↑↑
Siderophage/diffus verteilt	↓↓	↓↓	↑↑
Siderophage/herdförmig angeordnet	↓	n.s.	↑↑
Zellen im Drüsenlumen	↓↓	↓	↑↑
Zellen im Uteruslumen	↓↓	↓	↑↑

Legende: ↑/↓: Signifikanz  $0,05 > p > 0,001$ ; ↑↑/↓↓: Signifikanz  $p < 0,001$ , Pfeilrichtung (↑): der höhere Prozentsatz liegt bei erst genannter Gruppe, (↓): der höhere Prozentsatz liegt bei zweit genannter Gruppe; Feld grau hinterlegt = im Text erwähnt



**Tab.8: Übersicht der semiquantitativen Auswertung von Merkmalen, für die keine Gruppenvergleiche signifikant unterschiedlich sind.**

	Gruppe 1 gegen Gruppe 2	Gruppe 1 gegen Gruppe 3	Gruppe 2 gegen Gruppe 3
Drüsenassoziierte Siderophage	n.s.	n.s.	n.s.
Drüsenassoziierte Mastzellen	n.s.	n.s.	n.s.
Drüsenassoziierte eosinophile Granulozyten	n.s.	n.s.	n.s.
Eosinophile Granulozyten/herdförmig angeordnet	n.s.	n.s.	n.s.
Gefäßassoziierte eosinophile Granulozyten	n.s.	n.s.	n.s.
Gefäßassoziierte Plasmazellen	n.s.	n.s.	n.s.
Gefäßassoziierte Mastzellen	n.s.	n.s.	n.s.
Gefäßassoziierte Siderophage	n.s.	n.s.	n.s.
Lymphfollikel	n.s.	n.s.	n.s.
Lymphozyten subepithelial	n.s.	n.s.	n.s.
Lymphozyten/diffus verteilt	n.s.	n.s.	n.s.
Lymphozyten/herdförmig angeordnet	n.s.	n.s.	n.s.
Mastzellen/diffus verteilt	n.s.	n.s.	n.s.
Mastzellen/herdförmig angeordnet	n.s.	n.s.	n.s.
Neutrophile/herdförmig angeordnet	n.s.	n.s.	n.s.

**Legende:** ↑/↓: Signifikanz  $0,05 > p > 0,001$ ; ↑↑/↓↓: Signifikanz  $p < 0,001$ , n.s. = nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); Pfeilrichtung (↑): der höhere Prozentsatz liegt bei erst genannter Gruppe, (↓): der höhere Prozentsatz liegt bei zweit genannter Gruppe; Feld grau hinterlegt = im Text erwähnt

### 1.6. Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen

Für die bakteriologische Untersuchung wurden 23 von insgesamt 39 zur histologischen Auswertung verwendeten Uteri beprobt. Die Auswertung erfolgte semiquantitativ an Ausstrichen (vgl. Tab.13, S.175). Die Keime wurden mittels MALDI-TOF identifiziert (vgl. Kap. III.1.6.2., S.29). Die Ansprache der Uteri im Text mittels fortlaufender Nummerierung entspricht der in Tab.9, S.108.

In Gruppe 1 (nicht tragende Färsen) wurde in drei von sieben Fällen ein Kolonienwachstum festgestellt. Semiquantitativ konnten aus Uterus Nr.1 *Propionibacterium acnes* mit einem Wachstum von 7 Kolonien und *Staph. epidermidis* von 2 Kolonien aus 100µl Spülflüssigkeit isoliert werden. In Uterus Nr. 2 sind in höherer Anzahl *E. coli* ( $2 \times 10^2$ ) und *Strept. pluranimalium* ( $2 \times 10^1$ ) isoliert worden. In diesem Uterus wurden weitere Erreger mit einem Wachstum von unter 100 Kolonien festgestellt (vgl. Tab.9). Aus Uterus Nr. 3 konnte mit einem Wachstum von einer Kolonie *Staph. hominis* isoliert werden.

In Gruppe 2 „Endometritis purulenta“ wurde in den Isolaten aus allen beprobten Uteri (n=9) ein Kolonienwachstum festgestellt. In acht Fällen konnte eine Mischinfektion mit bis zu acht Erregern nachgewiesen werden. In vier der acht Fälle war *Trueperella pyogenes*, deren Kolonienwachstum  $10^6$  (obere Nachweisgrenze) pro 100 µl Spülprobe überstieg, überwiegend. In den 4 weiteren Fällen (Uterus Nr. 12-15) waren die vorherrschenden Keime *Histophilus somni* (>104), *Strept. dysgalactiae* ( $3 \times 10^2$  zusammen mit *Peptoniphilus indolicus*, >104), *Strept. pluranimalium* ( $5 \times 10^2$ ), und *Strep. uberis* (50) (die weiteren Erreger pro Isolat vgl. Tab.9; Gruppe 2). Aus dem Isolat aus Uterus Nr. 16, der keine Mischinfektion aufwies, konnte ein Kolonienwachstum von *E. coli* mit >105 nachgewiesen werden.

In Gruppe 3 (gynäkologisch klinisch gesunde Kühe) wurde in Isolaten von fünf der sieben beprobten Uteri ein Kolonienwachstum festgestellt. In diesen konnten mind. zwei und höchstens sechs Erreger nachgewiesen werden. In vier dieser fünf Fälle ist aus 100 µl Spülprobe eine bis max. zehn Kolonien jeweils unterschiedlicher Erreger gewachsen. Aus dem Isolat von Uterus Nr. 17. konnte kein Erreger für eine eitrige Entzündung festgestellt werden. Die Spülflüssigkeiten der Uteri Nr. 18 bis 20 wiesen ein sehr geringes Kolonienwachstum von einer Kolonie aus 100 µl Spülprobe auf. Dabei konnten

aus Uterus Nr. 18 *Streptococcus uberis* und in den Uteri Nr. 19 und Nr. 20 *Staphylococcus epidermidis* isoliert werden. Diese Erreger gelten als ubiquitär vorkommende Umweltkeime. Aus Uterus Nr. 21 konnten, neben 8 Kolonien *Geotrichum spp.* pro 100 µl, als einziges in dieser Gruppe eine höhere Anzahl eines Erregers (5x10<sup>3</sup> Kolonien *Strept. bovis*) isoliert werden. Da in dieser Gruppe deutlich mehr unterschiedliche Erreger isoliert wurden, aber das Kolonienwachstum äußerst gering war, folgt die Darstellung der weiteren Ergebnisse in tabellarischer Form (vgl.Tab.9).



Tab.9: Auflistung der durch bakteriologische Untersuchung isolierten Erreger aus Spülungen von Färsenuteri, klinisch erkrankten und gynäkologisch klinisch gesunden Uteri

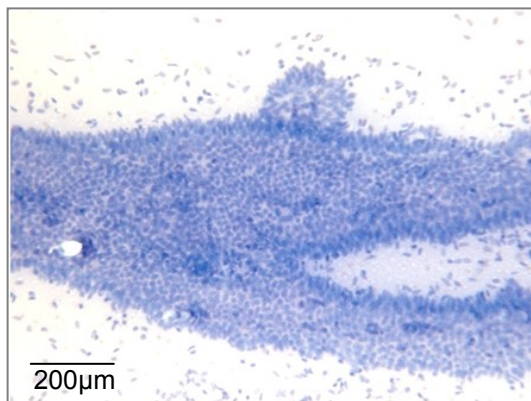
Gruppe	Nummerierung analog Aufzählung im Text	Einzelbefund	<i>Truiperella pyogenes</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Streptokokken</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	<i>Bacteroides</i> spp.	<i>Mannheimia</i> spp.	<i>E. coli</i>	<i>Histophilus somni</i>	<i>Peptoniphilus indolicus</i>	<i>Prorionibac-terium acnes</i>
1	1			✓	✓			✓	✓		✓	✓
	2			✓								
	3			✓								
	4 bis 7											
2	8	<i>Strep. dysgalactiae</i>	✓					✓	✓	✓		
	9	<i>Fusobacterium</i> spp.	✓								✓	
	10		✓			✓						
	11		✓			✓					✓	
	12		✓							✓		
	13				✓		✓					
	14						✓				✓	
	15	<i>Acinetobacter</i> spp.		✓	✓				✓			
	16											✓
	17	<i>Corynebacterium</i> spp.				✓						
3	18	<i>Arthrobacter</i> spp.	✓		✓							
	19		✓									
	20	<i>Pseudomonas</i> spp.		✓								
	21	<i>Geotrichum</i> spp.		✓	✓							
	22 und 23				✓	✓						

Legende: ✓ mit MALDI-TOF identifiziert, ■ Eitererreger, ■ unspezifische Keime, □ Umgebungskeime

### 1.7. Ergebnisse der zytologischen Untersuchungen

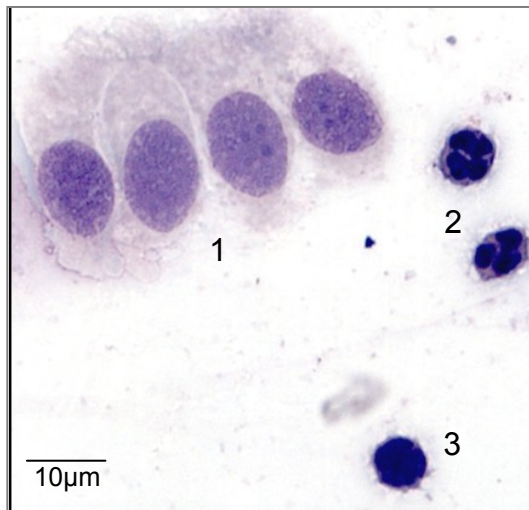
Parallel zu den bakteriologischen Untersuchungen wurde an den 23 Uteri eine qualitative und quantitative Zytologie durchgeführt. Die gewonnenen Ausstriche wurden wie unter Kapitel III.1.5, S.28 beschrieben gefärbt. Für Zellauszählung sowie Zellbeurteilung wurde die Fahne des Ausstriches bewertet, da die Zellen hier vereinzelt vorlagen. In Gruppe 1 „nicht tragende Färsen“ (n=7) wurde bei einem Tier 1 % PMN der zellkernhaltigen Zellen im zytologischen Ausstrich festgestellt. In den 6 weiteren Ausstrichen waren keine PMN zu finden. In Gruppe 2, Kühe mit „Endometritis purulenta“ (n=9) wurden bei allen neun Tieren PMN festgestellt. Im Mittel waren 38% der zellkernhaltigen Zellen PMN (Min/Max: 4%/69%). In Gruppe 3, „gynäkologisch klinisch gesunde Kühe“ (n=7) konnten in drei von sieben Fällen PMN nachgewiesen werden (3%/12%/12%). In den weiteren Ausstrichen wurden keine PMN gefunden.

Die qualitativen Untersuchungen wurden an Pappenheim und Giemsa gefärbten Ausstrichen durchgeführt. Gewebe- und Zellhaufen wurden nicht bewertet. In



**Abb.85: Zytologischer Ausstrich vom Endometrium einer Färse (Gruppe 1), Übersicht. Gewebeverband umgeben von vereinzelt Zellen; Giemsa-Färbung**

Gruppe 1 (nicht tragende Färsen) konnten qualitativ wenige Entzündungszellen festgestellt werden. Das intakte Endometrium ist oft als Verband abgelöst und übertragen worden (Abb.85). Die vereinzelt Zellen des Endometriums sind teilweise zerstört. Sie stellen sich als langgezogene Zellen dar. Der Zellkern befindet sich an der Basis, von der aus das Zytoplasma als Faden in die Richtung zeigt, in die ausgestrichen wurde. Dazwischen sind vereinzelt Entzündungszellen zu finden. Erythrozyten kommen selten vor.

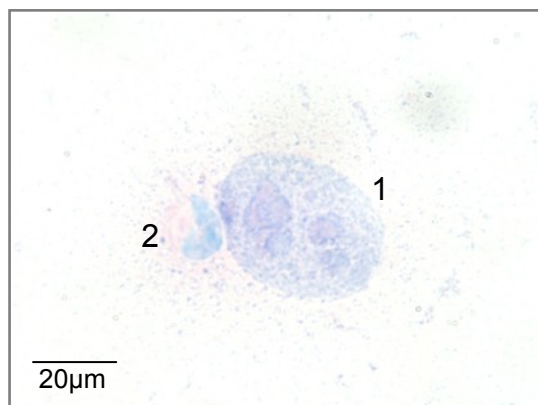


**Abb.86:** Ausschnitt aus einem zytologischem Ausstrich vom Endometrium einer Kuh mit Pyometra; 1: Endometriumszellen; 2: PMN; 3: Lymphozyt; Pappenheimer-Färbung

Die zytologischen Ausstriche der Gruppe 2 „Endometritis purulenta“ sind zellreicher. Es sind viele zellkernlose Zellen, unter anderem auch Bakterien zu finden, die zusammen mit Färbereste zu Artefakten führen. Die Artefakte nehmen vom Anfang des Ausstrichs zur Fahne hin ab. Selten sind Endometriumszellen intakt, kommen jedoch vor (Abb.86).

Das Gesichtsfeld wird hier von PMN dominiert.

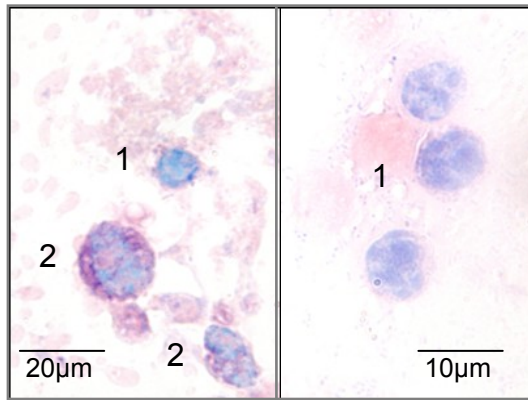
Es finden sich häufig Makrophagen, die schwer zu identifizieren sind (Abb.87), jedoch zusammen mit Plasmazellen die zweite Fraktion zellkernhaltiger Zellen



**Abb.87:** Ausschnitt aus einem zytologischem Ausstrich vom Endometrium einer Kuh mit Pyometra; 1: Makrophage; 2: PMN; Giemsa-Färbung

bilden. Die Identifikation gelingt am besten in Giemsa gefärbten Ausstrichen. Meist sind ihre Zellkerne zu erkennen. Lymphozyten sind deutlich zu erkennen und liegen eingestreut dazwischen. Mastzellen sind selten und schwer zu identifizieren. Häufig sind Zellen mit wenigen metachromatischen Granula der einzige Hinweis auf das Vorhandensein von Mastzellen.





**Abb.88: Ausschnitt aus einem zytologischem Ausstrich vom Endometrium einer Kuh mit Pyometra (links) und einer mit Verdacht auf sE (rechts); 1: Plasmazelle; 2: Mastzelle**

In Gruppe 3 „gynäkologisch klinisch gesunde Kühe“ sind neben Zellen des endometrialen Deckepithels überwiegend Plasmazellen zu finden (Abb.88). Die Zellen des Deckepithels sind häufig als Zellverbände zu finden, denen Mastzellen und Plasmazellen anliegen. Mastzellen scheinen häufig degranuliert zu sein. PMN und Lymphozyten sind ebenfalls gut zu identifizieren und liegen locker zwischen den Zellen eingestreut.

## 2. Ergebnisse der Untersuchungen an endometrialen Explants

Für eine weitergehende Untersuchung zum Entzündungsgeschehen wurde ein Explant-Modell aus endometrialem Gewebe erstellt und auf seine Funktionsfähigkeit untersucht. Hierbei stand die Vitalität im Vordergrund. Bisherige Untersuchungen gehen davon aus, dass Explants stets dieselbe Vitalität aufweisen, die durch Stimulation und Kultivierung unbeeinträchtigt bleibt. Zelltod ist Teil des Entzündungsgeschehens, das invitro durch die Stimulation untersucht wird. Dazu wurde in Vorarbeiten der WST-1-Test zur Bestimmung der Vitalität etabliert. Dieser wurde parallel zu molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen in einem Stimulationsversuch durchgeführt, wie in den folgenden Ergebnissen zu sehen ist.

### 2.1. Methodische Vorarbeiten zu Versuchen an endometrialen Explants

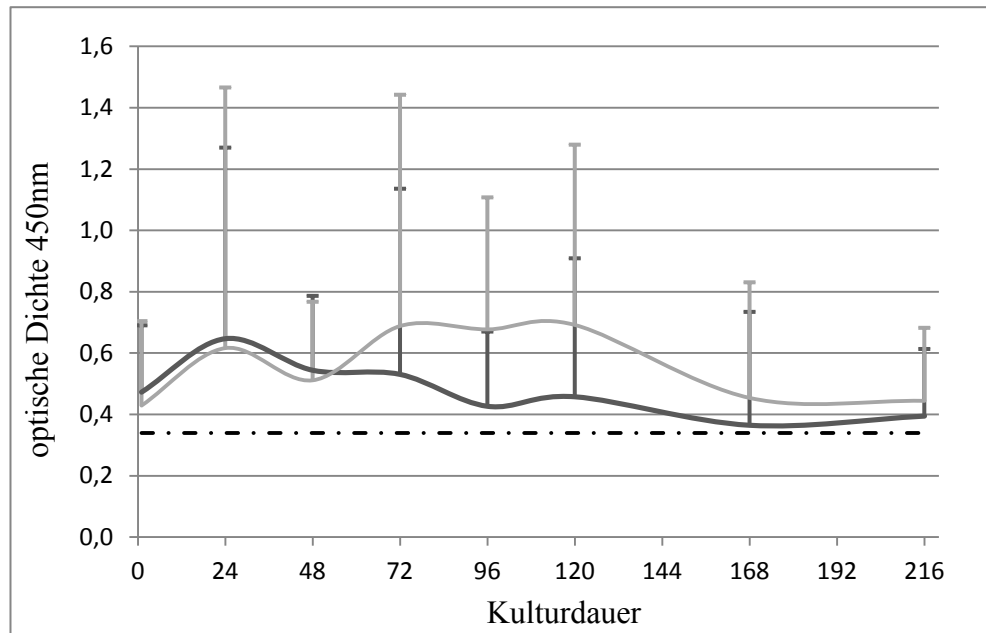
In Vorversuchen wurde der für adhärente sowie nichtadhärente Zellkulturen konzipierte WST-1-Proliferationstest hinsichtlich der Eignung für Gewebeexplants getestet.

Hierzu wurden Explants von 13 Färsenuteri über 9 Tage (216 h) mit täglichem teilweisen ( $\frac{1}{3}$ ) Medienaustausch einzeln in Zellkulturplatten (96 Well) kultiviert. Als Vergleichsgruppe im Sinne eines langsamen Zelluntergangs diente die

parallele Kultivierung von Explants ohne Medienaustausch. Die einmalige Messung von abgetöteten Explants diente als Anhaltspunkt für den Anteil unspezifischen Messsignals.

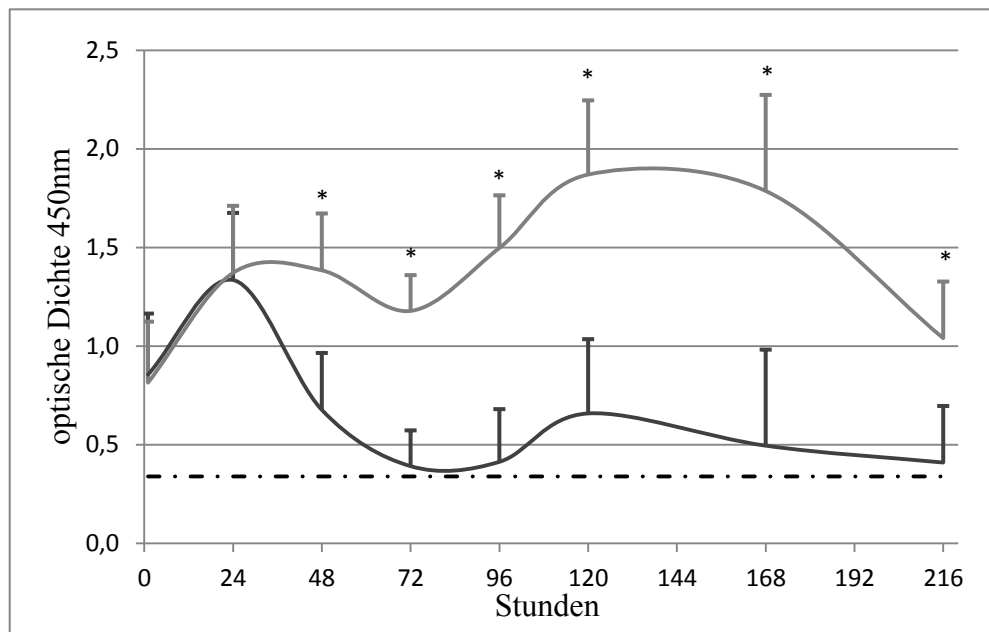
Alle 24 h wurden je Uteri 8 Explants (in Einzelfällen lediglich 7) entnommen und deren Vitalität mittels WST-1-Test bestimmt.

Die sehr hohe Standardabweichung sowie die relativ geringe Signal-to-Noise-Ratio (Abb.89) machte eine Testmodifikation notwendig.



**Abb.89: Vitalitätsbestimmung endometrialer Explants.** Dargestellt sind Median und Standardabweichung der optischen Dichte des WST-1-Test, ■ mit 50 von 150µl Mediumersatz, n = 94 im Mittel pro Zeitpunkt ■ ohne Mediumersatz, n = 96 im Mittel je Zeitpunkt und Behandlung, - · - Signallevel mit toten Explants

So führte der Einsatz eines Pools von 8 Explants je Reaktionswell zu einer deutlichen Verbesserung. In Abb.90 ist das WST-1 Signal gegen die 8 Entnahmezeitpunkte dargestellt. Für jeden Zeitpunkt wurden für 5 Uteri je 4 Reaktionsansätze ausgewertet.



**Abb.90: Vitalitätsbestimmung endometrialer Explants.** Dargestellt sind Median und Standardabweichung der optischen Dichte des WST-1-Test, ■ mit 50µl Mediumersatz ■ ohne Mediumersatz, — · — · Signallevel mit toten Explants, \* = signifikant unterschiedlich zur Vergleichsgruppe ( $p < 0,05$ ),  $n = 20$  je Zeitpunkt und Behandlung

Es zeigt sich ein für beide Ansätze gleicher biphasischer Verlauf. Dem Anstieg zu einem ersten Maximum zur Stunde 24 folgt am 5ten Tag ein zweiter Gipfel. Beiden Maxima folgte nur für Explants mit Medienaustausch ein 1 bzw. 2-tägiges Signalplateau. Der Abfall am Tag 9 auf etwa das Ausgangsniveau (Explants mit Medienaustausch) bzw. auf Höhe des unspezifischen Messsignals für die Vergleichsgruppe (Explants ohne Mediumersatz) beendete den Versuch. Ab Stunde 48 unterscheiden sich alle Werte der Messgruppe (Explants mit Mediumersatz) zur Vergleichsgruppe signifikant ( $p < 0,05$ ) (Abb.90).

Folgende Zusammenfassung bildet die Grundlage für das weitere Vorgehen im folgenden Stimulationsversuch.

- 1) Das Poolen von 8 Explants je Reaktionswell gleicht Unterschiede zwischen den einzelnen Explants aus, das Untersuchungsmaterial wird also homogener.
- 2) Für eine Versuchsdurchführung mit Stimulation der Explants bietet sich der Zeitraum 24 bis 48 Stunden bei Kultivierung mit Mediumersatz an.
- 3) Die über 72 h hinausgehende Kultivierung beinhaltet die Gefahr einer selektiven Zellvermehrung, also einer Änderung der ursprünglichen Gewebezusammensetzung.



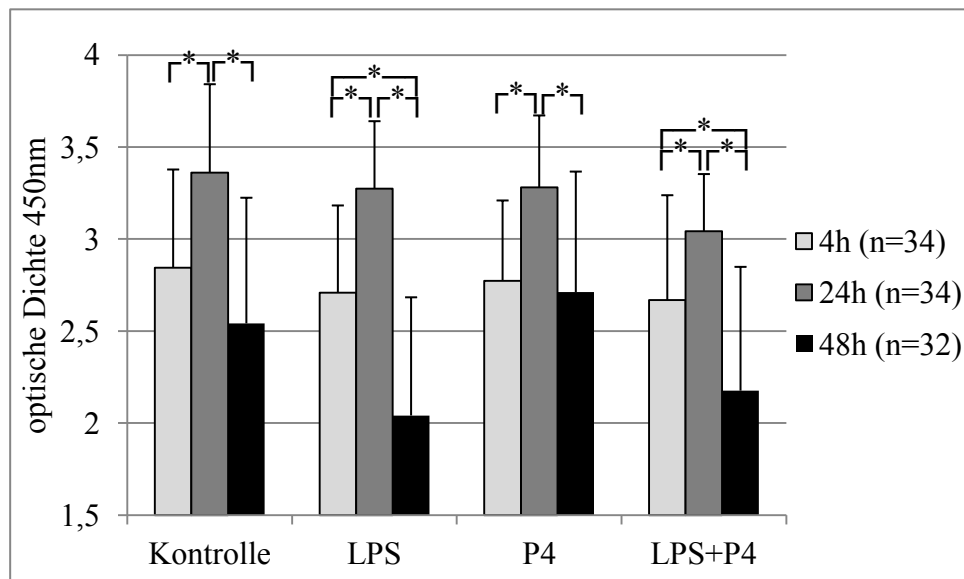
## **2.2. Stimulationsversuche an endometrialen Explants**

In einer weiterführenden Versuchsreihe wurden unstimulierte und mit LPS stimulierte Explants eingesetzt und physiologisch, molekularbiologisch und histologisch untersucht. Die Explants wurden ausschließlich aus Uteri von Färsen (n=17) erstellt. Im Stimulationsversuch wurden vier verschiedene Behandlungen gewählt. In Behandlung eins wurden lediglich 50 µl Medium ersetzt, es stellt die Kontrollbehandlung dar. Bei Behandlung zwei wurden die Explants mit 3 µg/ml LPS und in Behandlung 3 mit 5 ng/ml Progesteron stimuliert, Behandlung vier ist die Kombination aus LPS (3 µg/ml) und Progesteron (5 ng/ml). Die Stimulation erfolgt nach einer Stunde der Inkubation. Mit jedem Mediumersatz wurden auch der Stimulus bzw. Supplement in entsprechender Konzentration ersetzt. Die Proben wurden jeweils nach 4, 24 und 48 h entnommen. Die Auswertung erfolgte mit dem Vitalitätstest WST-1, in Migrationskammerbioassay, durch qRT-PCR und histologisch (siehe III.2 S.30).

### **2.2.1. Vitalität endometrialer Explants nach Stimulation**

Wie unter III.2.3.2 (S.32) beschrieben, wurde der WST-1-Test dem Medium zugefügt und anschließend photometrisch ausgewertet. In die Auswertung gingen je 34 Testreaktionen (17 Uteri im Doppelansatz) für die Behandlungszeitpunkte 4h und 24 h sowie 32 (16 Uteri im Doppelansatz) für 48 h ein. Eine Testreaktion zeigt die Vitalität von 8 gepoolten Explants an. Für den Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Behandlung wurde nach Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur ein Signifikanzlevel von  $p < 0,017$ , für den Vergleich der Zeitpunkte zwischen den Behandlungen von  $p < 0,008$  festgelegt.

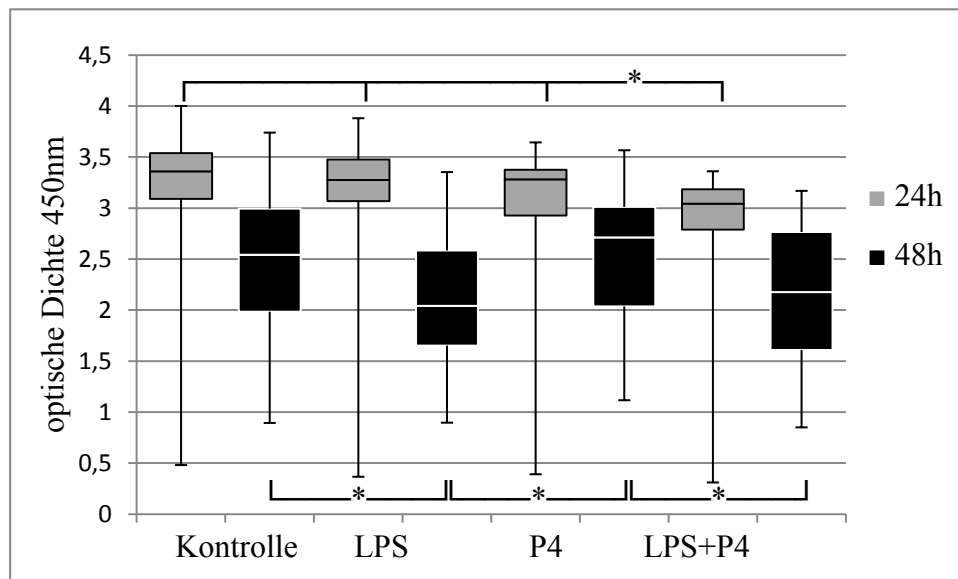
In der folgenden Abbildung ist für jeden Untersuchungszeitpunkt Median und Standardabweichung der Farbentwicklung, gruppiert nach Art der Stimulation, angetragen (Abb.91, S.115). Innerhalb der Stimulation steigt die Vitalität im Zeitraum 4 h bis 24 h an (+20% für Kontrolle und LPS, +16% für P4 und Kombination LPS+P4) und fällt dann behandlungsspezifisch zum Zeitpunkt 48 h wieder ab. Anstieg und Abfall innerhalb der Stimulation ist jeweils signifikant mit  $p < 0,017$ . Nur bei LPS Beteiligung ist auch der Vergleich 4 h vs. 48 h signifikant unterschiedlich ( $p < 0,017$ ).



**Abb.91: Vitalitätsbestimmung von Explantpräparationen in Abhängigkeit von Kulturbedingungen und -zeit. Median und Standardabweichung des WST-1 Test an 8 zusammen inkubierten endometrialen Explants pro Test; Kontrolle: ohne Zusatz; LPS: 3µg/ml LPS; P4: 5ng/ml Progesteron; LPS+P4: Kombination von 3µg/ml LPS und 5ng/ml Progesteron, \* = signifikant unterschiedlich, n= 33 Testreaktionen im Mittel pro Zeitpunkt; (LPS=Lipopolysaccharid, P4=Progesteron)**

Der Einfluss der Stimulation auf die Vitalität innerhalb der Zeitpunkte ist als Box-Plot dargestellt (Abb.92, S.116). Beim zweiseitigen Klassentest ergeben sich zum Zeitpunkt 24 h jeweils nur gegenüber der Kombinationsbehandlung (LPS+Progesteron) signifikante Unterschiede ( $p < 0,008$ ). Weder eine LPS noch eine Progesteronstimulation beeinträchtigt die Vitalität gegenüber der Kontrollgruppe.

Nach 48 h unterscheiden sich alle Stimulationen mit LPS-Beteiligung von der Kontrolle, bzw. reiner Progesteronstimulation. Die Minderung der Vitalität um 5% bis 6% ist hier statistisch signifikant ( $p < 0,008$ ). Eine Ausnahme bildet hier die Kombinationsbehandlung (LPS+P4), deren geringere Vitalität im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit  $p = 0,064$  nicht signifikant unterschiedlich ist.



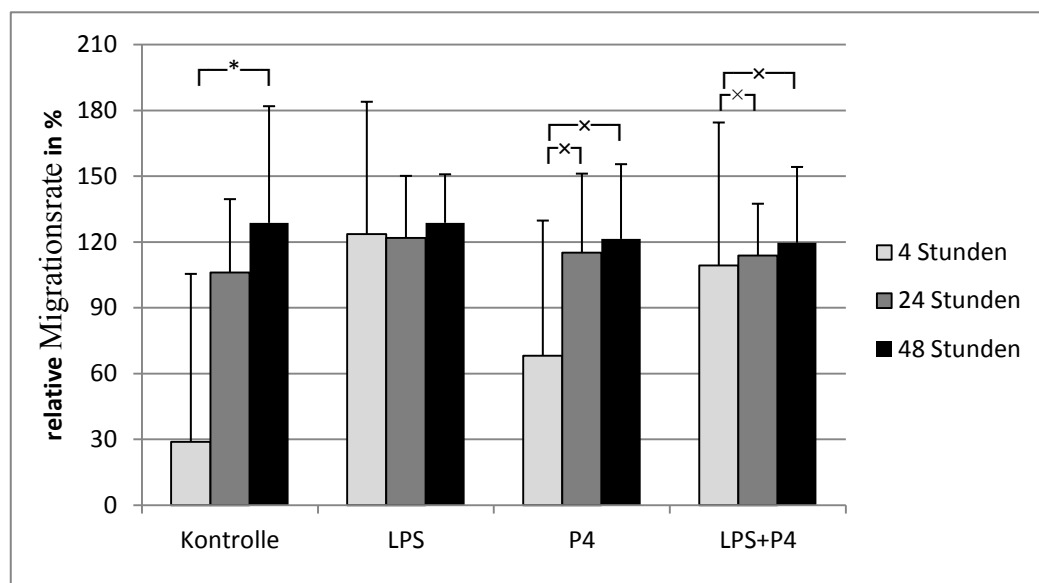
**Abb.92: Vitalitätsbestimmung von Explantpräparationen in Abhängigkeit von Kulturbedingungen und -zeit.** WST-1 Test an 8 zusammen inkubierten Explants pro Test nach 48 Stunden dargestellt in einem Boxplot; Kontrolle: ohne Zusatz; LPS: 3µg/ml LPS; P4: 5ng/ml Progesteron; LPS+P4: Kombination von 3µg/ml LPS und 5ng/ml Progesteron;  $p < 0,008$ . LPS: Lipopolysaccharid, P4: Progesteron, \* = signifikant unterschiedlich

### 2.2.2. Chemotaxis behandelter Explants im Bioassay

Wie in III.2.3.1 (S.31) beschrieben, wurden die Überstände in einen Bioassay eingesetzt. Die durch die Explants gebildeten chemotaktischen Substanzen können so nachgewiesen werden. Für die Auswertung wurden die Überstände von mindestens 3 Reaktionsansätzen je Uterus ( $n=17$ ) vereinigt und in der Migrationskammer eingesetzt. Technisch bedingt standen für den Zeitpunkt 4h nur 16 Uteri, für die Zeitpunkte 24 h und 48 h je 17 zur Verfügung. Eine Testreaktion zeigt demnach die relative Migrationsrate (im Vergleich zu 100ng/ml IL-8) des vereinigten Überstandes von 3x8 gepoolten Explants an. Für den Vergleich der Zeitpunkte innerhalb einer Stimulationsart wurde ein Signifikanzlevel von  $p < 0,017$  (Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur), für den Vergleich der Zeitpunkte zwischen den Behandlungen von  $p < 0,008$  (Mann-Whitney-Test mit Bonferroni-Korrektur) festgelegt. In der folgenden Abbildung (Abb.93, S.117) ist für jeden Untersuchungszeitpunkt Median und Standardabweichung der relativen Migrationsrate (100% = 100 ng/ml IL-8), gruppiert nach Art der Stimulation, angetragen. In der statistischen Auswertung zeigen sich bis auf einen Vergleich (4 h vs. 48 h in der Kontrollgruppe) innerhalb wie zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

So bleibt folgendes festzuhalten:

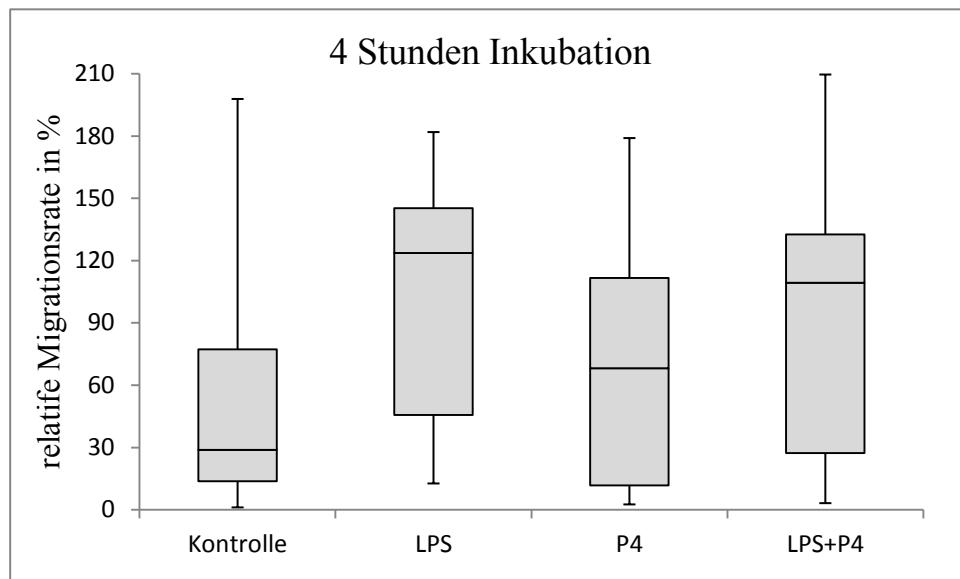
- 1) Innerhalb wie zwischen den Behandlungsgruppen sind keine Unterschiede im Migrationsassay zwischen 24 und 48 h Inkubationsdauer festzustellen.
- 2) Nur in der Kontrolle und bei Progesteronstimulation ist ein Anstieg von 4h zu 24 h ( $p > 0,017$ ) nachweisbar. Bis 48 h Inkubationsdauer bleibt die Chemoattraktivität bei allen Behandlungsgruppen unverändert hoch.
- 3) Bei allen Stimulationen mit LPS Beteiligung ist schon nach 4h die maximale relative Migrationsrate erreicht.



**Abb.93: Chemotaxis von Explantpräparationen in Abhängigkeit von Kulturbedingungen und -zeit.** Median und Standardabweichung der relativen Migrationsrate der Kulturüberstände von 3\*8 inkubierten endometrialen Explants pro Test; Kontrolle: ohne Zusatz; LPS: 3µg/ml LPS; P4: 5ng/ml Progesteron; LPS+P4: Kombination von 3µg/ml LPS und 5ng/ml Progesteron; 100% entsprechen der Stimulation mit 100ng/ml IL-8; \* = signifikant unterschiedlich  $p < 0,008$ , x = Tendenz,  $0,017 < p < 0,05$ ,

Wie in Abb.94 zu sehen ist, unterscheiden sich die Mediane mit einer Inkubationsdauer von 4 h zwischen den Behandlungen, jedoch nicht die Boxen bzw. die Standardabweichungen, wodurch sich kein signifikanter Unterschied ergibt. Um eine Teststärke von mindestens 80% zu erhalten bei einem Fehler 1. Art von  $< 0,05$  müssten für einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und LPS Stimulation 59 Uteri getestet werden und für einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und der kombinierten Stimulation mit LPS und Progesteron 119 Uteri. Dies war im Rahmen dieser Untersuchung nicht möglich.





**Abb.94: Chemotaxis von Explantpräparationen in Abhängigkeit von Kulturbedingungen bei 4 Stunden Inkubationszeit.** Boxplot der relativen Migrationsrate der Kulturüberstände von 3\*8 inkubierten endometrialen Explants pro Test nach 4h Stimulation; Kontrolle: ohne Zusatz; LPS: Stimulation mit 3µg/ml LPS; P4: Stimulation mit 5ng/ml Progesteron; LPS+P4: Kombination von 3µg/ml LPS und 5ng/ml Progesteron. 100% entsprechen der Stimulation mit 100ng/ml IL-8.

### 2.2.3. Molekularbiologischen Untersuchungen

Die relative Genexpression der Entzündungsmediatoren CXCL8, NF-κB und IκB wurde durch qRT-PCR (III.2.3.4 S.34) ermittelt. Als Referenzgen wurde das Housekeeping Gen SUZ12 gewählt. Die Auswertung wurde mit der Software REST 2009 (Qiagen) durchgeführt. Nachstehende Tabelle (Tab.10) zeigt die relativen Expressionsergebnisse für CXCL8, NF-κB und IκB unter Angabe des Expressionsfaktors, der Richtung (up/down) sowie des Signifikanzniveaus für die Behandlungsgruppen und deren Inkubationszeiten.

**Tab.10: Relative Expressionsergebnisse für CXCL8, NF-κB und IκB für die Behandlungsgruppen**

Gen/ Beprobungs- zeitpunkt	Regula- tionsfaktor up/down	p-Wert			
CXCL8	LPS	P4		LPS+P4	
4 Stunden	12,18 ↑	p<0,0001	1,66 ↔	p=0,023	9,77 ↑ p<0,0001
24 Stunden	4,28 ↑	p<0,0001	2,44 ↑	p=0,019	3,22 ↑ p=0,005
48 Stunden	6,01 ↑	p<0,0001	4,36 ↑	p=0,001	5,75 ↑ p=0,001
NF-κB					
4 Stunden	5,44 ↑	p<0,0001	2,16 ↑	p=0,075	2,46 ↑ p=0,01
24 Stunden	2,61 ↑	p<0,0001	2,01 ↔	p=0,086	1,51 ↔ p=0,27
48 Stunden	1,74 ↔	0,18	1,84 ↔	0,18	1,61 ↔ 0,28
Iκb					
4 Stunden	9,39 ↑	p<0,0001	1,97 ↑	p=0,005	2,19 ↑ p=0,039
24 Stunden	1,66 ↔	p=0,142	1,74 ↔	p=0,1	2,12 ↑ P=0,023

**Legende:** ↑: Genexpression ist gegenüber dem Housekeeping-Gen erhöht, ↔: gleichbleibend.

CXCL8 (IL-8) ist eines der Hauptchemokine für PMN. Gegenüber der Kontrolle wurde seine Expression in allen Behandlungen zu jedem Zeitpunkt erhöht, über alle Zeitpunkte ist der Expressionsfaktor in Gruppen mit LPS Beteiligung höher als ohne, die höchsten Werte werden bei LPS-Stimulation erreicht. Die Expressionsfaktoren sind bei Stimulation mit LPS-Beteiligung nach 4 h Inkubation am höchsten, erreichen nach 24 h ein Minimum (auf ca. 1/3 des 4h Wertes), um dann zum Zeitpunkt 48 h erneut anzusteigen auf ca. 50% des Eingangswertes

bei 4 h. Alle Expressionsfaktoren sind hochsignifikant unterschiedlich zur Kontrolle ( $p \leq 0,005$ ).

NF- $\kappa$ B ist ein Transkriptionsfaktor für die Regulation der Immunantwort und Apoptose. Er reguliert mehrere Chemokine. Eine signifikante Up-Regulation findet sich nach 4 h nur unter Stimulation mit LPS Beteiligung, nach 24 h nur noch ohne Progesteron-Beteiligung. Nach 48 h ist für keine Stimulationsart eine NF- $\kappa$ B Regulation mehr nachzuweisen. Explants reagieren auf LPS Kontakt also schnell mit einer Erhöhung der Expression von NF- $\kappa$ B.

I $\kappa$ B ist das Inhibierungsprotein von NF- $\kappa$ B. Es wird von NF- $\kappa$ B abgespalten, wodurch NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor aktiviert ist.

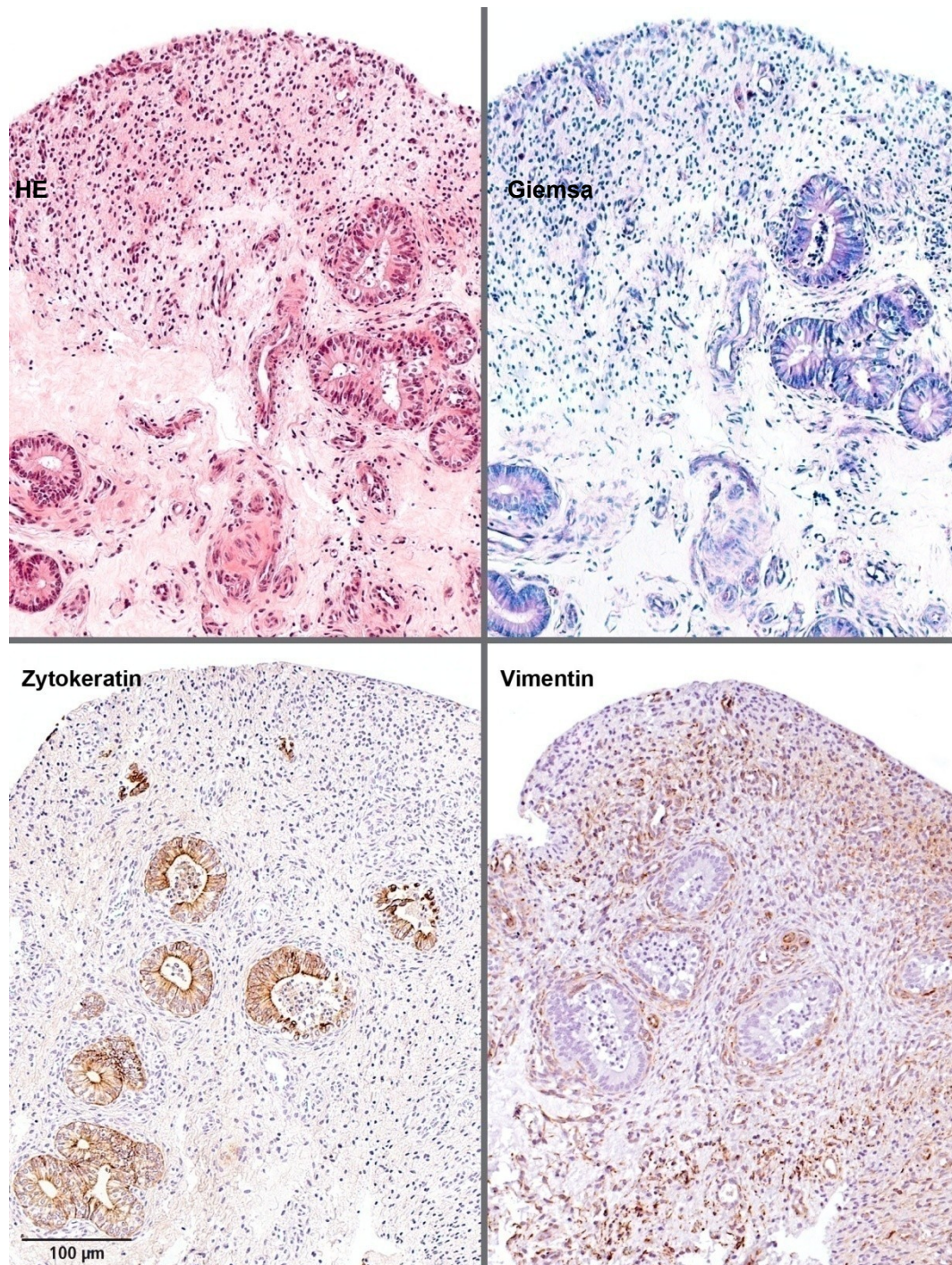
I $\kappa$ B ist nach 4 h für alle Stimulationsarten gegenüber der Kontrolle hochreguliert. Besonders ausgeprägt trifft dies für die Exposition der Explants mit LPS zu (9fache Exprimierung). Nach 24 Stunden findet für I $\kappa$ B keine hochsignifikante up-Regulation mehr statt. Ausnahme ist die weiterhin signifikante Regulation in der Stimulation mit LPS und Progesteron. Hier ist das Expressionslevel allerdings relativ niedrig und nicht unterschiedlich zu Zeitpunkt 4h.

#### **2.2.4. Histologische Befunde an endometrialen Explants nach Behandlung**

Ziel dieser Untersuchung war es, histologische und immunhistologische Unterschiede der Zellzusammensetzung in den Explants nach unterschiedlicher Kulturdauer dazustellen. Die Explants wurden wie unter III.2.3.3 (S.32) beschrieben fixiert, gefärbt und geschnitten. Für die histologischen Untersuchungen wurde je Behandlung und Zeitpunkt 1 Schnitt nach Färbung mit HE und Giemsa bewertet. Die immunhistologische Färbung mit zytokeratinspezifischen bzw. vimentinspezifischen Antikörpern an je zwei Schnitten diente der Identifikation der endometrialen Epithelzellen bzw. der Identifizierung des Stromas und der Beurteilung des Fibrozytenwachstums (Abb.95; S.121)

Beim Vergleich zwischen den Gruppen konnte semiquantitativ keine Aussage über Unterschiede getroffen werden. Zwischen den Zeitpunkten waren bei allen Behandlungen morphologische Veränderungen zu sehen. Die Drüsenzellen zeigten nach 24 und 48 Stunden degenerative Veränderungen. Sie stellten sich nach 48 Stunden häufig als mit Zelldetritus gefüllte Hohlräume dar. Die Zellkerne wurden pyknotisch. Das Stroma zeigte sich nach 24 Stunden locker und nach 48 Stunden stark aufgelockert. Anschnitte von Gefäßen waren in jedem Präparat zu

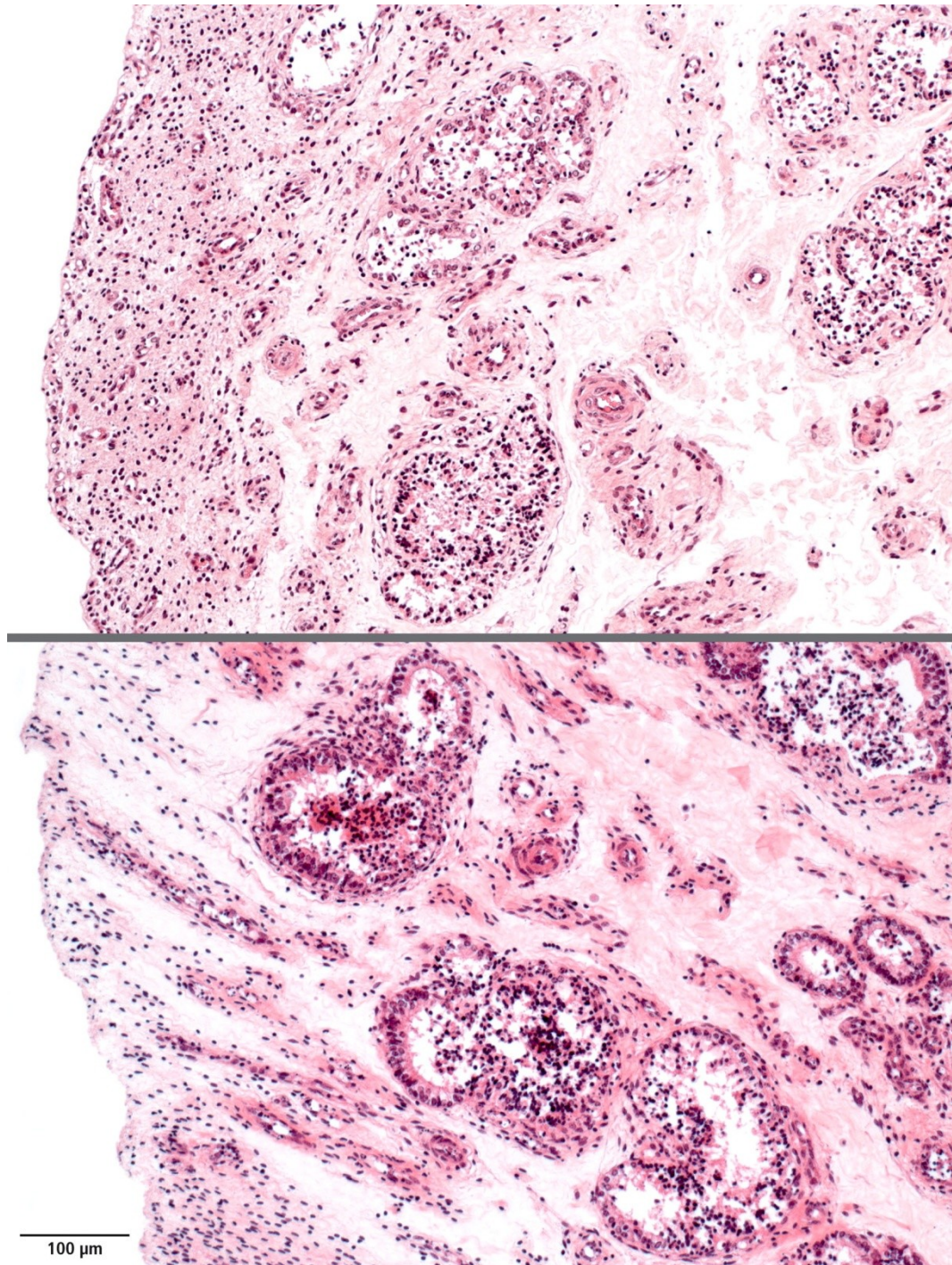
sehen (Abb.96, S.122). In diesem Merkmal konnten keine Veränderung zwischen den Behandlungen und Zeitpunkten ausgemacht werden. Aus der Fraktion der Entzündungszellen konnten Mastzellen eindeutig identifiziert werden.



**Abb.95: Endometriale Explants nach 4 Stunden Inkubation, oben: mit HE (links) und Giemsa (rechts) gefärbt; unten: immunhistochemische Färbung von zytokeratinhaltigen Zellen (links) und vimentinhaltigen Zellen (rechts), die vier unterschiedlichen Färbungen erbrachten keinen Zugewinn an Information über die Zellzusammensetzung. Durch die Giemsafärbung lassen sich Mastzellen eindeutig identifizieren.**

Sie waren auch nach 48 Stunden vorhanden und zeigten in Form und Anfärbbarkeit keinen Unterschied zu denen im Präparat nach 4 Stunden (Abb.95)





**Abb.96: Endometriale Explants nach 24 Stunden (oben) und 48 Stunden (unten) Inkubation: mit HE gefärbt. Das Drüsenlumen ist über die Kulturzeit stärker mit Zelldetritus gefüllt.**

Durch die immunhistochemische Färbung von Zytokeratin konnte der Untergang der Zellen ebenfalls gut dargestellt werden. Aufgrund der guten Darstellung mit der HE-Färbung konnte hier kein Zugewinn an Informationen erreicht werden. Mit der Färbung von vimentinhaltigen Zellen konnte das Stroma identifiziert werden. Zwischen den Behandlungen konnte kein Unterschied erkannt werden. Nach 24 und 48 Stunden ist eine Lockerung zu sehen (Abb.96). Auch hier konnte

kein Zugewinn an Informationen gegenüber der HE-Färbung erreicht werden. Das Fibrozytenwachstum ist nur schwer zu beurteilen. Neubildungen, die vom Explant ausgehen, konnten nicht erkannt werden. Die Zellkomposition bleibt bei allen Behandlungen gleich.



## **V. DISKUSSION**

Einerseits unterliegt der Uterus des Rindes durch hormonelle Steuerung morphologischen Veränderungen. Andererseits wird er durch die hohe Reproduktionsleistung und der damit einhergehenden Belastung durch Trächtigkeit, Geburt und Puerperium physiologisch stark gefordert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Uterus im Krankheitsfall und im gesunden Zustand untersucht. Durch die histologische, zytologische und bakteriologische Auswertung können die einzelnen Formen im Kontext beurteilt werden. Im zweiten Teil wurde ein Explant-Modell für das Endometrium untersucht. Durch den Zusatz von LPS und Progesteron konnten unterschiedliche Reaktionen in der Vitalität und auf molekularbiologischer Ebene gezeigt werden.

### **1. Histologische Untersuchungen**

#### **1.1. Vergleich gesunder und erkrankter Uteri**

Bei dem histologischen Vergleich von gesunden und erkrankten Uteri standen grundlegende Veränderungen im Vordergrund. Morphologische Veränderungen und freie Endzündungszellen im Gewebe wurden beschreibend und semiquantitativ dargestellt. Die Untersuchung von gesunden Uteri fand an den Organen von Färsen statt. Sie sind noch unbeeinträchtigt durch eine Gravidität oder das Puerperium. Durch das Einsetzen des Zyklus untersteht der Uterus hormonbedingt morphologischen Veränderungen. Diese sind durch die Untersuchung im Diöstrus ausgeblendet. In Uteri gesunder Färsen zeigt sich das Endometrium gleichmäßig von Drüsenanschnitten durchsetzt. Dies ändert sich bei Kühen, die schon eine Trächtigkeit hatten. Bei Kühen mit einer deutlichen uterinen Entzündung zeigen sich die Drüsenanschnitte mit zum Großteil gesunden Drüsenzellen. Sie sind in der Gesamtzahl jedoch deutlich reduziert. VOLLMERHAUS (1958) beschreibt die Verteilung von Drüsen und den Anteil am Gewebe über den Zyklusverlauf. Im Östrus wird die Verteilung, aufgrund der ebenfalls beobachteten Ödematisierung großräumiger und der Anteil verringert sich, da die Ausdehnung des Gewebes zunimmt.

In den vorliegenden eigenen Untersuchungen kann die deutliche Reduzierung der Drüsenanschnitte in den Gruppen der „Endometritis purulenta“ und



„gynäkologisch klinisch gesunde Kühe“ jedoch nicht auf eine gleichwohl vorhandene Ödematisierung und damit einer Zunahme der Gewebsdicke zurück geführt werden. Die Verteilungsmuster der Drüsenanschnitte innerhalb dieser Gruppen unterscheiden sich nicht zwischen ödematisierten und nicht ödematisierten Uteri. Vielmehr gibt die Auswertung den Hinweis, dass die Gesamtanzahl der Drüsenanschnitte reduziert ist. Das weist darauf hin, dass die Drüsen mit zunehmendem Alter zugrunde gehen und nur ungenügend ersetzt werden.

Endometrose findet sich in allen drei Gruppen. Bei den Gruppen „Klinische Endometritis und Pyometra“ und „gynäkologisch klinisch gesunde Kühe“ ist das Vorkommen der Endometrose gegenüber den Färsen signifikant unterschiedlich. Beim Pferd wird die Endometrose als Indikator für die subklinische Endometritis gesehen. So unterscheiden LEHMANN et al. (2011) sowie SCHOON (1997) das Vorkommen dieses Erkrankungsbildes beim Pferd in eine aktive, inaktive, nicht destruierende und destruierende Form. In dieser Arbeit wurde die Endometrose meist ohne eine Beteiligung von freien Zellen beobachtet, womit die Unterscheidung in eine aktive und inaktive Form nicht nachvollziehbar ist. RODENBUSCH (2011) beschreibt die Endometrose, unter den oben genannten Aspekten, beim Rind. Eine aktive und inaktive Form tritt auch hier nicht auf, wohl aber eine destruierende und nicht destruierende Form. Da in den Lokalisationen Endometrosen unterschiedlicher Morphologien nebeneinander beobachtet wurden, ist der Untergang des Drüsenepithels mit einer Endometrose verbunden. Wobei es scheint, dass die Entwicklung der Endometrose in den einzelnen Drüsenabschnitten parallel verläuft. Der Auslöser für die Umgestaltung dieser Gewebeabschnitte ist nicht ersichtlich. Da freie Zellen in seltenen Fällen zu sehen sind und luminal kein pathogener Reiz vorliegt, lässt es auf eine intrinsische Ursache schließen.

Das Vorkommen von Fibrose wurde in der Gruppe mit Verdacht auf subklinische Endometritis gefunden. Es konnten drei verschiedene Fibrosen unterschieden werden: die periglanduläre, die subepitheliale und die interstitielle Fibrose. Die periglanduläre Fibrose ist in Biopsien zur Untersuchung von Endometritiden beschrieben (BONNETT et al., 1991b). Die fibrotische Veränderung wird hier mit

der Infektion von *A. Pyogenes* in Verbindung gebracht. Die Beobachtung von periglandulärer Fibrose kann nicht mit dem Vorkommen eines bestimmten Erregers in Verbindung gebracht werden. Vielmehr scheint es, als könnte es die Vorstufe zur Endometrose sein. Dafür spricht auch, dass keine Entzündungszellen in diesen Abschnitten zu sehen sind. Ebenso wie bei der Endometrose, die ohne eine Beteiligung von Entzündungszellen abläuft.

Die subepitheliale und interstitielle Fibrose tritt bei Tieren mit Verdacht auf eine subklinische Endometritis auf. Da dieser Befund während der qualitativen Untersuchungen gestellt wurde, konnte er in der parallel verlaufenden semiquantitativen Auswertung nicht berücksichtigt werden, da die berücksichtigten Merkmale vorher festgelegt wurden. Eine Quantifizierung im Zusammenhang mit dem Progesteronwert könnte einen Aufschluss über die Bedeutung geben. Beim Pferd werden diese Formen unabhängig von einer Endometrose in Verbindung mit einer verringerten Progesteronsynthese als Indikator für unregelmäßige Zyklen und den Verlust von Embryonen angesehen (SZOSTEK et al., 2012). Da die Tiere in dieser Arbeit nur zu einem Zykluszeitpunkt untersucht wurden, ist dieser Sachverhalt beim Rind grundsätzlich nicht auszuschließen. Die fibrotischen Veränderungen treten hingegen nur in geringem Ausmaß auf, sodass das Ausbleiben einer erfolgreichen Implantation dadurch nur schwer nachzuvollziehen ist.

## **1.2. Entzündung des Endometriums**

Die Betrachtung hochgradig entzündeter Uteri zeigte, dass eine Entzündung die Integrität des Endometriums beeinträchtigen kann. Das Oberflächenepithel, als erste Barriere, ist hierbei morphologischen Veränderungen unterworfen. Jedoch ist auch bei solchen Tieren, mit erheblichem entzündlichem Exsudat im Uterus, ein intaktes Endometrium zu finden. BONNETT et al. (1991c) finden in Biopsien vom Endometrium, die 26 bzw. 40. Tage p.p. entnommen wurden und einen positiven bakteriologischen Befund aufwiesen, ausschließlich hochprismatisches intaktes Endometrium. Dies weist darauf hin, dass das Endometrium einerseits hoch regenerativ ist, andererseits als Barriere gegen pathologische Organismen im Puerperium bestehen bleibt. In der Gruppe „Klinische Endometritis und Pyometra“ sind vor allem im *Str. compactum* und an den Läsionen große Ansammlungen von PMN beobachtet worden. In den beiden anderen Gruppen „Färsen“ und „Verdacht auf subklinische Endometritis“ konnten keine Läsionen

gefunden werden. Ebenfalls wurden in diesen Gruppen nur selten PMN am bzw. im Endometrium sowohl subepithelial als auch lumenseits beobachtet. Dies lässt im Umkehrschluss vermuten, dass die Migration der PMN bei geschädigtem Endometrium erleichtert sein könnte. Da in der Gruppe „Klinische Endometritis und Pyometra“ große Ansammlungen von PMN im Gewebe auch bei intaktem Endometrium gefunden wurde, kann keine Aussage über den Einfluss von Läsionen auf das Migrationsverhalten von PMN gemacht werden

Mastzellen sind in den Gruppen „Färsen“ und „Verdacht auf subklinische Endometritis“ regelmäßig im Endometrium zu finden. Dabei ordnen sie sich homogen im Gewebe an, sind aber auch regelmäßig als bandförmige Ansammlung subepithelial im *Str. compactum* zu beobachten. Wie andere Arbeiten übereinstimmend zeigen, treten Mastzellen regelmäßig im Endometrium (GALEOTTI et al., 1997; KUTHER et al., 1998; EREN et al., 2010; LIU et al., 2012) auf. Die Anordnung ist dabei unterschiedlich beschrieben. EREN et al. (2010) konnte an unauffälligen Uteri von multiparen Rindern Ansammlungen von MHC II positiven Mastzellen sowohl perivascular als auch periglandulär darstellen. Beim Schwein wurde dies in Abhängigkeit von der Gestationsdauer beobachtet, wobei die Verteilung im übrigen Gewebe gleich blieb (LIU et al., 2012).

In der eigenen Untersuchung konnten im Gewebe Ansammlungen von Mastzellen weder perivascular bzw. periglandulär noch herdförmig beobachtet werden. Vielmehr scheint es eine zum Endometrium hin gerichtete Anordnung zu geben. In der Gruppe „Klinische Endometritis und Pyometra“ treten Mastzellen, die vermehrt Metachromasie zeigen, hauptsächlich nahe am Myometrium auf. In Richtung Endometrium bzw. Entzündungsherd können nur vereinzelt degranulierte Zellen dargestellt werden, die im zytologischen Ausstrich besser differenziert werden können. Sie sind ebenfalls stark degranuliert. BELLUZZI et al. (2004) konnten bei gesunden Tieren und Tieren mit Endometritis keinen unterschiedlichen Gehalt an Mastzellen feststellen. Die Aktivierung und Reaktion von Mastzellen im Endometrium des Rindes muss nach diesem Abbild mit einer hochgradigen Entzündung einhergehen. Dies kann aufgrund einer hochgradigen Infektion mit pathogenen Mikroorganismen geschehen, wie CORBEIL et al. (2005) experimentell in vitro zeigten.

Das Auftreten von Lymphozyten im *Str. compactum* beim Rind wurde schon von BONDURANT (1999) beschrieben. Es fiel auf, dass sie im Zusammenhang mit

einer Trächtigkeit häufig intraepithelial auftreten (OLIVEIRA & HANSEN, 2008). Bei den vorliegenden Untersuchungen zur subklinischen Endometritis spielen sie eine untergeordnete Rolle. Durch die immunhistochemische Differenzierung konnten hauptsächlich T-Lymphozyten dargestellt werden. Bei fast allen Säugern kommen T-Lymphozyten an unterschiedlichen Oberflächenepithelien vor (HOWARD et al., 2004). Zwischen der Gruppe „Färsen“ und „Verdacht auf subklinische Endometritis“ zeigen sich in den distalen, häufig dilatierten Drüsenabschnitten Unterschiede. Das Einhergehen mit dilatierten Drüsen ist vermutlich auf die Einwirkung der Infiltration zurück zu führen. Die T-Lymphozyten sammeln sich vor allem an der Basis und drängen von dort zwischen die Drüsenzellen. Dadurch erschwert sich der Abtransport durch die Zilien der Drüsenzellen. Dieser Vorgang lässt sich mit einer obstruktiven Bronchitis vergleichen.

Die Aggregation von Lymphozyten, bei der ebenfalls T-Lymphozyten im Vordergrund stehen, unterscheidet sich darin, dass die Zellen nicht zwischen die Drüsenzellen infiltrieren. Zudem sind lymphozytäre Aggregate perivaskulär und im Gewebe beobachtet worden. Dies wurde sowohl bei vielen Spezies als auch beim Menschen beobachtet (PEREZ-MARTINEZ et al., 2002). Mit den Ergebnissen der bakteriologischen Untersuchung kann der Befund nicht in Verbindung gebracht werden. COBB and WATSON (1995) untersuchten das Auftreten der lymphozytären Aggregation über den Zyklusverlauf und kamen zu dem Schluss, dass es zum natürlichen Bild des Endometriums gehört, sowie zur Trächtigkeit und zur Endometritis. B-Lymphozyten nehmen in diesen Untersuchungen eine untergeordnete Rolle ein. Als freie Zellen sind sie locker eingestreut. In der Gruppe „Klinische Endometritis und Pyometra“ treten sie in Gesellschaft von Plasmazellen auf, die aus B-Lymphozyten hervorgehen.

Plasmazellen zeigen in den einzelnen Gruppen ein deutlich unterschiedliches Verhalten. In der Gruppe „Klinische Endometritis und Pyometra“ sind Plasmazellen als ein breites Band subepithelial zu finden, das in geringerer Ausprägung auch in der Gruppe „Verdacht auf subklinische Endometritis“ auftritt. Diese Beobachtung stimmt überein mit Untersuchungen beim Kamel (TIBARY et al., 2006) und beim Mensch. Die chronische Endometritis wird teilweise als chronische plasmazytische Endometritis bezeichnet (SMITH et al., 2010). Beim Menschen betrifft diese Form 3-10% der Frauen mit anormalen Menstruationsblutungen und Infertilität. Die Diagnose wird an Biopsien, die mit



Methylenblau (wie Giemsa) oder immunhistochemisch gefärbt sind, durchgeführt (ADEGBOYEGA et al., 2010). Die Beteiligung weiterer Entzündungszellen wird diskutiert. ECKERT et al. (2002) fanden, dass diese Plasmazellen bei gesunden Frauen zyklusunabhängig in Biopsien vorkommen, bei Infertilität jedoch erhöht sind. Zur Unterscheidung der chronischen Endometritiden schlagen sie die Berücksichtigung von PMN vor. Da Plasmazellen in dieser Untersuchung selten mit PMN beobachtet wurden und das Ausmaß der Plasmazellinfiltration unabhängig von PMN war, ist der Vorschlag nicht ohne weiteres auf das Rind übertragbar.

### **1.3. Zytologische und bakteriologische Befunde**

Die zytologischen und bakteriologischen Untersuchungen sind bei mehr als der Hälfte der Tiere durchgeführt worden. Diese zeigen, auch im geringeren Rahmen als die histologischen Untersuchungen, dass uterine Entzündungen komplex sind. Für die Diagnose der subklinischen Endometritis wird ein Anteil von PMN an der Gesamtanzahl zellkernhaltiger Zellen in einem Bürstchenausstrich im Bereich von 5% bis  $\leq 18\%$  herangezogen (SHELDON et al., 2006). Für uterine Spülungen liegt dieser Wert bei 10%, wobei die Werte mit der Zeit p.p. abnehmen (KASIMANICKAM et al., 2004; SHELDON et al., 2010). Für die Gruppe 2 „Verdacht auf subklinische Endometritis“ konnte nach dieser Methode bei zwei Tieren eine subklinische Endometritis diagnostiziert werden. Diese Tiere waren zum Zeitpunkt der Probenahme 18 und 20 Monate p.p. Bei weiteren Tieren dieser Gruppe konnten keine PMN im Ausstrich gefunden werden. Der Durchschnitt lag hier bei 8 Monaten p.p. Die Tiere mit „Klinischer Endometritis und Pyometra“ waren hingegen im Durchschnitt 11,5 Monate nach der letzten Abkalbung. Dies zeigt, dass sich Entzündungen lange hinziehen oder wiederkehren können. Da die subklinische Endometritis häufig ein chronischer Charakter unterstellt wird und histologisch ein deutlicher Unterschied zum Endometrium zu sehen ist, kann dies nicht der Grund für eine mögliche Fehldiagnose sein.

Qualitativ unterscheiden sich die Ausstriche voneinander. Endometriumszellen sind häufig lädiert und teilweise als Gewebezusammenhänge zu sehen. Bei stark entzündeten Tieren ist das Bild durch die Entzündungsprodukte getrübt. Die Methode ist stark von der Durchführung und dem Untersucher abhängig. In anderen Arbeiten wurde dieser Fehler durch eine Auswertung von zwei Untersuchern korrigiert (SENOSY et al., 2009; MCDOUGALL et al., 2011).

Mechanisierte Teilschritte sind hierbei nicht durchgeführt worden. Die Beschädigung der Zellen muss nicht grundsätzlich durch die Probenahme geschehen. Durch das Abbild der Epithelzellen scheint es eher, als würde dies beim Ausstreichen passieren. Dieser Fehler könnte durch eine mechanisierte Übertragung in sanfter Weise behoben werden.

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen spiegeln die Ergebnisse früherer Arbeiten wieder (HUSSAIN et al., 1990; SHELDON et al., 2008; WESTERMANN et al., 2010; MCDOUGALL et al., 2011). Interessant ist hierbei, dass WESTERMANN et al. (2010) bei Untersuchungen zum Zusammenhang von zytologischen und bakteriologischen Ergebnissen herausfand, dass nur bei dem Vorkommen von *Arcanobacterium pyogenes* ausreichend PMN für eine subklinische Endometritis Diagnose gefunden wurden.

## **2. Untersuchungen an endometrialen Explants**

### **2.1. Vitalität endometrialer Explants**

Endometriale Explants werden beim Rind seit Langem zur Untersuchung physiologischer und pathophysiologischer Eigenschaften des Endometriums eingesetzt (VESTERINEN et al., 1980). Dabei wird das Verhalten von Zellkulturen zugrunde gelegt. Dies kann so nicht eindeutig übernommen werden, da das Explant eine Mischkultur darstellt, bei der Zellen mit unterschiedlichem physiologischem Verhalten und Lebensdauer inkubiert werden. Wie LOSONSKY et al. (1999) an Gastrointestinalen Endometrium zeigte, eignen sich Explants für komplexe Anwendungsversuche, zeigen aber auch Schwächen. In dieser Arbeit wurde die Vitalität von endometrialen Explants untersucht. Die Frage stand im Raum, wie lange endometriale Explants lebensfähig sind und ob die Vitalität über die Zeit variiert. Dazu wurde ein Vitalitätstest WST-1 etabliert. LOPEZ et al. (2008) konnte mit demselben Test bei Explant aus humanem Knorpelgewebe eine konstante Vitalität über 15 Tage nachweisen, bei ausreichender Funktionalität für molekularbiologische Untersuchungen. Endometriale Explants und Explants aus Knorpelgewebe unterscheiden sich grundlegend in ihrer Zellzusammensetzung. Knorpelgewebe ist in sich homogener, wodurch die Konstanz zu erklären ist. Die Vitalität von endometrialen Explants zeigt ein erstes Maximum nach 48 Stunden. Ein zweiter Anstieg und die höchste Vitalität wurden zwischen den Stunden 96 und 168 gemessen. Dies kann von der Zusammensetzung der Explants abhängig

sein. Drüsenzellen und Deckepithelzellen haben einen höheren Zell-Turnover als Stroma Zellen (ZARZYNSKA & MOTYL, 2008), was ebenfalls durch die Histologie nachgewiesen werden konnte. Dies kann den ersten Anstieg erklären. Die Zellen adaptieren sich an die neue Situation und zeigen nach dem Stress der Explant-Gewinnung eine normale Vitalität. Nachdem diese mesenchymalen Zellen absterben (erst Abnahme der Vitalität) kommt es möglicherweise zur fibrozytischen Umgestaltung des Stromas, womit es zu einer höheren Zellzahl nicht nativer Zellen kommt. In den histologischen Untersuchungen zum Hauptversuch konnte dies nicht eindeutig nachgewiesen werden. Einerseits fand die Beprobung bis zur 48. Stunde statt und andererseits reichte die Quantifizierung mittels immunhistochemischer Färbung von Vimentin dafür nicht aus.

## **2.2. Stimulationsversuch**

Im Hauptversuch wurde untersucht, ob verschiedene Behandlungen einen Einfluss auf die Vitalität haben. Gleichzeitig spiegeln die unterschiedlichen Auswertungen die Funktionalität in Abhängigkeit von der Vitalität und den Behandlungen wieder. Die Vitalität zeigt nach der Inkubation einen Anstieg. Bis zur 24. Stunde unterscheiden sich die Behandlungsgruppen nicht signifikant. Zur Stunde 48 nimmt die Vitalität wieder ab. In den Behandlungsgruppen ist diese Abnahme signifikant unterschiedlich. (BORGES et al., 2012) hat in einer umfangreichen Untersuchung Ähnliches festgestellt. Mittels In-situ-Hybridisierung konnten sie apoptotische Zellen nachweisen. Die Anzahl dieser Zellen war nach 48 Stunden gegenüber 6 Stunden erhöht. Die Stimulation von Explants mit LPS hat nach dieser Untersuchungsmethode keinen Einfluss auf die Vitalität, was den histologischen Befunden entspricht. Ob durch In-situ-Hybridisierung und beschreibende histologische Auswertungen Aussagen über die Vitalität gemacht werden können, bleibt fraglich. Der Untergang von mesenchymalen Zellen zeigt sich am besten in der immunhistochemischen Färbung von Zytokeratin sowie in HE gefärbten Präparaten. Der Untergang von Stromazellen kann anhand pyknotischer Zellkerne erkannt werden. Diese sind ohne mechanisierte Auswertung nicht quantifizierbar.

Sexualhormone haben einen Einfluss auf das Entzündungsgeschehen am Uterus. So entwickeln ovarioektomierte Kühe, die mit Progesteron behandelt wurden, nach artifizieller Infektion häufiger eine Endometritis als Kühe, die mit Estradiol

behandelt wurden (DHALIWAL et al., 2001). Die Konzentration von Progesteron ist für die Versuche mit Explants im physiologischen Bereich gewählt (HERATH et al., 2006). Die Explants wurden ausschließlich von Tieren mit einem prominenten Gelbkörper gewonnen, wodurch das Endometrium unter Progesteroneinfluss steht. Der Versuchsansatz ist so gewählt, um die Wirkung von Progesteron auf native Explants und bei Stimulation durch LPS darzustellen. Explants, die mit Progesteron inkubiert werden, haben die gleiche Vitalität wie native Explants. Die Vitalität von Explants, die mit LPS und Progesteron inkubiert werden, ist nicht signifikant unterschiedlich zur Inkubation mit LPS, jedoch zu den vorhergenannten. Dies zeigt, dass die Stimulation durch LPS einen Einfluss auf die Vitalität hat. DEL VECCHIO et al. (1992) konnte in einem in vivo Versuch zeigen, dass artifiziell infizierte Kühe eine Endometritis entwickeln, wobei die peripheren Progesteronwerte den gleichen Verlauf nahmen wie die Kontrolle. Der darauffolgende Zyklus blieb jedoch aus. Der in vitro Ansatz zeigt, dass Progesteron keinen protektiven Einfluss auf Endometriumzellen hat. Die durch die Stimulation beeinträchtigten Zellen gehen früher zugrunde, so dass die Zellfunktion geschädigt ist. MILLER et al. (2007) konnte in Explantkulturen zeigen, dass die PGF2 $\alpha$  Produktion durch LPS Stimulation reduziert ist. Durch die Bestimmung der Vitalität kann gezeigt werden, dass stimulierte Zellen gegenüber unbehandelten Zellen in einer wesentlich schlechteren physiologischen Lage sind. Die Produktion von PGF2 $\alpha$  ist durch den Untergang gestört, was das Ausbleiben des Östrus im oben beschriebenen in vivo Versuch erklärt.

Die Auswertung mittels Bioassay zeigt die bestehende Funktionsfähigkeit der Zellen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden sind nicht signifikant. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass im Überstand der Explants nach 24 Stunden der Inkubation bereits Zellabbauprodukte sind, die chemotaktisch auf PMN wirken. Nach 4 Stunden der Inkubation ist ein Unterschied zwischen den Gruppen, der nach strenger statistischer Auswertung nicht signifikant ist. Die Explants sind in einer relativ geringen Menge Medium inkubiert. Für den Bioassay wurde der gesamte Überstand verwendet, der durch ein Sieb abzentrifugiert wurde. Nach Resuspension ist der Überstand von allen Partikeln über 30  $\mu$ m frei, jedoch sind kleinere Partikel gelöst. Diese können nach wie vor an der Membran Chemotaxis verursachen, dass die Effizienz beeinflusst. Dass die Gruppen sich in der CXCL8 (IL-8) Expression unterscheiden, zeigt die Auswertung mittels qRT-PCR. Hierbei



sind die Gruppen 2 und 4, in denen LPS eingesetzt wurde bis zur 24. Stunde unterschiedlich zur Gruppe 1 und 3. Nach 48 Stunden steigt der Wert in Gruppe 3, so dass alle drei Gruppen, bei denen ein Stimulus bzw. Supplement eingesetzt wurde, unterschiedlich zu Gruppe 1 sind. BORGES et al. (2012) kann in der oben erwähnten Arbeit einen Unterschied zwischen Stunde 24 und 48 bei LPS stimulierten Zellen im ELISA feststellen. Dies entspricht Gruppe 2 und 4. Sie kann aber auch zeigen, dass sich in der Kontrolle IL-8 akkumuliert. Das Ergebnis der qRT-PCR Auswertung für Gruppe 3 würde in diesem Kontext bedeuten, dass die Zellen nach 48 Stunden unter Progesteroneinfluss mehr CXCL8 exprimieren. Die Transkription NF- $\kappa$ B und sein inhibierendes Protein I $\kappa$ B sind im großen Maße an der Kontrolle von normal zellulären und Prozessen auf Organebene, wie Apoptose, zelluläres Wachstum und Entzündungen beteiligt (PACIOLLA et al., 2011). In den Versuchen mit endometrialen Explants wurde die Translation von NF- $\kappa$ B durch die Stimulation von LPS und die Supplementation von Progesteron bis zur 24. Stunde hochreguliert, in dem Versuchsansatz mit LPS und Progesteron bis zur 4. Stunde. Die Translation von I $\kappa$ B ist in dieser Gruppe bis zur 24. Stunde hochreguliert, in den beiden anderen bis zur 4. Stunde. In Vitro Studien haben gezeigt, dass bei Entzündung I $\kappa$ B nur in den ersten Stunden vermehrt exprimiert wird, NF- $\kappa$ B hingegen über mehr als 24 Stunden (SUN & ANDERSSON, 2002). Dies zeigt sich in der Stimulation mit LPS. Progesteron setzt ebenfalls die NF- $\kappa$ B Translation in Gang. Dies ist sowohl in der Inkubation mit Progesteron, als auch mit LPS und Progesteron zu sehen. In letzterem Fall wird I $\kappa$ B gegenüber NF- $\kappa$ B länger transkribiert. ROSS et al. (2010) konnte bei Schweinen feststellen das I $\kappa$ B bei der Implantation hoch reguliert wird. MUNOZ et al. (2012) konnte auf Proteomeben zeigen, dass NF- $\kappa$ B beim Rind zum Zeitpunkt der Implantation abnimmt. Die Implantation ist nicht mit der Stimulation durch LPS zu vergleichen, jedoch stellt sie für das Endometrium eine Umstellung durch Apoptose und Antigenpräsentation dar. Da NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B auf mehreren Ebenen der Zellfunktion eine Rolle spielen, ist das gegenläufige Ergebnis in diesem Kontext nachzuvollziehen, NF- $\kappa$ B sich bei überschießender Transkription durch I $\kappa$ B selber inhibiert.

### **3. Schlussbetrachtung und Ausblick**

Die histologische Betrachtung von Uteri im gesunden, wie im erkrankten Zustand, gibt einen weitreichenden Aufschluss über die beteiligten pathologischen

Mechanismen. Es können sowohl auf der zellulären Ebene als auch auf morphologischer Ebene Veränderungen zwischen gesunden nicht tragenden Färsen, gynäkologisch klinisch gesunden Kühen und klinisch erkrankten Tieren festgestellt werden. Im Vergleich zu den zytologischen und bakteriologischen Untersuchungsmethoden ist die Histologie für eine Einteilung der Entzündungsgrade präziser. Wobei sich gezeigt hat, dass eine Entzündung im Endometrium als komplexes Geschehen abläuft, bei dem sich auf der zellulären Ebene das Vorkommen von Plasmazellen zwischen den beiden Gruppen signifikant unterscheiden. Sie sind in der Gruppe der klinisch erkrankten Tiere dominierend. Die Gruppe der gynäkologisch klinisch gesunden Tiere, die nach Auswertung der Tierdaten auch als Tiere mit subklinischer Endometritis gesehen werden kann, zeigt ebenfalls eine erhöhte Anzahl an Plasmazellen. Entzündungszellen und pathologische Mechanismen, die für ein akutes Geschehen sprechen, treten in dieser Gruppe in den Hintergrund. So spricht das Vorhandensein von Endometrose für ein chronisches Krankheitsbild. PMN wurden in der Gruppe der klinisch erkrankten Tiere am häufigsten und in großer Anzahl gefunden. Sie sind damit signifikant unterschiedlich häufiger als in den beiden anderen Gruppen, zwischen denen es einen solchen Unterschied nicht gibt. Die Befunde der Gruppe „gynäkologisch klinisch gesund“, bei der die Involution schon vollzogen war, lassen darauf schließen, dass eine PMN-Beteiligung mit der Zeit nach dem Abkalben abnimmt. Mit Hinblick auf die subklinische Endometritis zeigen die Befunde, dass eine Einteilung dieser Erkrankung aufgrund von PMN-Vorkommen unzureichend ist. Vielmehr können sie als Nachweis einer Entzündung dienen, die durch die Beteiligung anderer Zellen, wie den Plasmazellen, als subklinische Endometritis charakterisiert werden kann. Um die an der subklinischen Endometritis beteiligten Entzündungszellen einzugrenzen, sollten an den Gewebeproben von infertilen Kühen, mindestens zwei histochemische Färbungen sowie immunhistochemische Färbungen zur Differenzierung von Plasmazellen, Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen durchgeführt werden.

Auf molekularbiologischer Ebene ist die Translation von Entzündungsfaktoren zu berücksichtigen, wobei sich die Rolle der einzelnen zellulären Komponenten herausstellen sollte. Dies ist vor allem für die Chemotaxis der B-Lymphozyten interessant, die sich zu Plasmazellen ausdifferenzieren.

Auf dieser Ebene ist auch die Aktivität des unspezifischen Immunsystems

interessant. Durch den Nachweis von Translationsfaktoren kann einerseits die Aktivierung der primären Immunantwort im Endometrium untersucht werden, welche auch die PMN-Aktivität beeinflusst. Andererseits kann die Beteiligung des Komplementsystems beurteilt und vergleichend ein mögliches Übersteuern ermittelt werden, wodurch die Beteiligung nicht zellulärer, z. B. antimikrobieller Proteine nachweisbar wird, die ihrerseits einen Einfluss auf die Fruchtbarkeit haben.

Übereinstimmend ist eine morphometrische Auswertung von histologischen Präparaten unterschiedlich entzündeter und gesunder Rinderuteri sinnvoll. Dabei ist die Morphologie des Epithels und der Drüsen zu berücksichtigen. Die Epithelhöhe, in Abhängigkeit vom Progesteronwert und der Zeit nach dem Abkalben, ist interessant für die physikalische Beeinträchtigung des Endometriums im Falle einer subklinischen Endometritis. Da keine Läsionen in dieser Arbeit festgestellt werden konnten, aber aufgrund der kleinen untersuchten Flächen (im Vergleich zum gesamten Uterus) nicht ausgeschlossen werden können, ist dies eine Möglichkeit, Beeinträchtigungen festzustellen. Die morphometrische Auswertung von Drüsenanschnitten ist für die Aufklärung und Beteiligung der Endometrose unabdingbar. Des weiteren ist bei Tieren mit einer anhaltenden Infertilität die Anzahl und die Fläche der Drüsen interessant, da hiermit auch die Sekretionsfähigkeit und eine potenzielle Hypersekretion festgestellt werden können.

Durch die morphometrische Auswertung von Einzelzellen kann einerseits die Beteiligung von Plasmazellen konkretisiert werden, andererseits die Rolle von unregelmäßig auftretenden Entzündungszellen wie PMN, Mastzellen oder Lymphozyten aufgeklärt werden. Dies sollte unter Berücksichtigung des physiologischen Zustandes des Endometriums oder einem physiologischen Anhaltspunkt, wie z. B. einem Geschlechtshormon geschehen.

Die Untersuchungen an endometrialen Explants zeigen, das kultiviertes Gewebe in den ersten 48 Stunden eine genügende Vitalität aufweist, um pathophysiologische Abläufe zu untersuchen. Um das Modell optimal zu nutzen, ist es sinnvoll, die Untersuchungen an weiteren Kultivierungsmethoden durchzuführen. Hierbei ist interessant, inwieweit die Kultivierungsdauer bei gleichbleibender Vitalität verlängert werden kann. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der WST-1 Test nur in Systemen mit Kultivierung der Explants in Flüssigkeit angewendet werden kann.

Das Explantmodell für endometriales Gewebe eignet sich hervorragend für die Untersuchungen molekularbiologischer Vorgänge. Dies ist vor allem für die bis heute ungenügend erforschten Mechanismen zur Verbesserung der Fruchtbarkeit interessant. Es kann genauer untersucht werden, wie sich intrauterine Behandlungen, sei es auf medikamentöser oder desinfizierender Basis, auf endometriale Explants auswirkt. Die Berücksichtigung der Vitalität ist hierbei zu berücksichtigen, da ein unspezifisches Untergehen von Zellen durch die Behandlung direkt nachgewiesen wird und gleichzeitig die Ergebnisse vergleichbar werden.

In Bezug auf die subklinische Endometritis bietet das Modell Möglichkeiten, um auf molekularbiologischer Ebene die Vorgänge chronischer Entzündungen zu studieren. Hierbei ist vor allem interessant, inwiefern die Kulturüberstände von zugrunde gegangenen endometrialen Explants gesunder und infertiler Kühe bei einer folgenden Inkubation mit frischen vitalen Explants eine Immunreaktion hervorrufen. Dies kann in erster Ebene durch die Translation von Nf- $\kappa$ B nachgewiesen werden. Die Vitalität kann Aufschluss über Apoptose oder Entzündung geben, wobei letztere durch den Nachweis verschiedener Chemokine charakterisiert werden kann. Da die subklinische Endometritis nicht durch eine Infektion begründet ist, stellt dies eine invitro Annäherung zum besseren Verständnis des Krankheitskomplexes dar.





## VI. ZUSAMMENFASSUNG

In der Milch- und Fleischrinderhaltung ist die erfolgreiche Reproduktion ausschlaggebend für die Wirtschaftlichkeit. Dies fordert hohe Geburtenzahlen und geringe Zwischenkalbezeiten, was wiederum von der Gebärmuttergesundheit abhängt. Die peripartale Phase ist insbesondere bei der hochleistenden Milchkuh durch eine sehr hohe Erkrankungsinzidenz gekennzeichnet; Gebärmutterentzündungen haben dabei eine besonders große Bedeutung. Diese werden bis zum Tag 21 post partum (p.p.) als Metritiden und ab 21 Tage p.p. als Endometritiden bezeichnet. Die morphologische und funktionelle Charakterisierung der Endometritiden war das übergeordnete Thema des Projektes.

Die Diagnostik der subklinischen Endometritis (sE), deren Unterscheidung von klinischen Endometritisformen und das Verständnis zugrunde liegender Pathogenesemechanismen, stehen derzeit im Fokus wissenschaftlicher Aktivitäten. Die subklinische Endometritis tritt ohne klinische Symptomatik auf und kann im Praxisalltag nur als Verdachtsfall diagnostiziert werden.

Erstes Ziel dieses Projekts war es, durch gründliche histologische Analysen gezielt ausgewählter Uteri von Schlachtkühen, entzündlich bedingte uterine Veränderungen zu erfassen. Im ersten Schritt wurden gesunde Uteri (Gruppe „Färsen“= klinisch geschlechts gesunde Färsen) und klinisch erkrankte Uteri (Gruppe „Klinische Endometritis und Pyometra“) in einer umfänglichen histologischen Betrachtung verglichen. Außerdem wurde eine dritte Gruppe gebildet, deren Vorbericht den „Verdacht auf subklinische Endometritis“ zuließ. Alle Tiere mussten bei Schlachtung einen Blütegelbkörper aufweisen.

Die histologischen Schnitte wurden mittels enzymhistochemischer (Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase) immunhistochemischer (CD3, CD20, CD79a, MAC387) und histochemischer (Hämalaun-Eosin, nach Giemsa, Eisen-Darstellung nach Perls) Methoden gefärbt. Durch die histologische Untersuchung der Uteri von „Färsen“ (=gesund) und Uteri, die eine „klinische Endometritis oder Pyometra“ aufwiesen, konnte die klare Differenzierung zwischen Physiologie und Pathologie erreicht werden. Bei der anschließenden Analyse der Uteri von Tieren mit „Verdacht auf sE wurden deutliche Abweichungen von diesen beiden Gruppen

festgestellt. Morphologisch konnte bei der Gruppe „Verdacht auf sE“ ein vermehrtes Auftreten von Endometrose, Fibrose und dilatierten Drüsen festgestellt werden. Der Vergleich von gesunden und entzündeten Uteri berücksichtigte auch die semiquantitative Bewertung des Vorkommens von freien Zellen: Uteri mit „Verdacht auf sE“ unterscheiden sich deutlich, durch ein moderates Auftreten von Lymphozyten-Aggregaten und Infiltration mit Plasmazellen, von den gesunden Uteri. Bei Tieren mit „klinischer Endometritis oder Pyometra“ konnten diese beiden Merkmale in deutlich größerem Umfang als bei „Verdacht auf sE“ festgestellt werden. PMN konnten, auch nach Darstellung mittels Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase, nur bei Tieren mit „klinischer Endometritis oder Pyometra“ in erhöhter Menge nachgewiesen werden, nicht aber bei Kühen mit „Verdacht auf sE“. Die Verdachtsdiagnose „subklinische Endometritis“ wird jedoch derzeit auf der Basis des erhöhten Nachweises von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) in den zytologischen Untersuchungen bestimmt. In den eigenen Untersuchungen wurden bei etwa der Hälfte der Fälle auch zytologische Auswertungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass der alleinige PMN-Nachweis im Uterusabstrich für eine belastbare Diagnose der sE nicht ausreichend ist. So konnten bei Färsen erwartungsgemäß keine PMN im zytologischen Ausstrich nachgewiesen werden. In der Zytologie von Uteri mit „klinischer Endometritis oder Pyometra“ konnten bei allen Tieren PMN nachgewiesen werden. Jedoch konnten nur bei zwei der Tiere mit „Verdacht auf sE“ zytologische durch erhöhte PMN-Zahlen eine sE diagnostiziert werden.

Im zweiten Teil wurde anhand von Explants aus endometrialen Gewebestücken ein ex vivo Modell zu endometrialen Entzündungsreaktionen etabliert. Bei weitgehend erhaltener Gewebeintegrität sollten Schlüsselfaktoren entzündlicher uteriner Prozesse als Reaktion auf relevante Stimuli erfasst werden. In Vorversuchen wurde mit dem WST-1-Test eine Methode zur Vitalitätsbestimmung etabliert, der auf wasserlöslichen Tetrazoliumsalz basiert. Im Hauptversuch wurden neben der Vitalität der Explants, auch die mRNA-Expression von Interleukin 8 (IL-8; CXCL8), NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B mittels PCR und Kapazität des Gewebes zur Synthese von chemoattraktiven Substanzen im Migrations-Bioassay bestimmt. Durch histologische Untersuchungen wurden zu dem die Zellen der Explants charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Lipopolysaccharid (LPS), ein Membranbestandteil von *E.coli*, einen signifikant

negativen Einfluss auf die Gewebevitalität hat. Gleichzeitig wurde mittels PCR und Migration-Bioassay gezeigt, dass die Zellen bei sinkender Vitalität die Entzündungsmediatoren IL 8, NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B exprimieren. Außerdem zeigten die Explant-Experimente, dass eine alleinige Progesteron (P4)-Exposition keine Veränderungen hervorrief, die über die Kultureffekte der unbehandelten Kontrollen hinausging. Bei Simultanexposition der Explants mit LPS und P4 reagierten die Explants in der Tendenz wie bei alleiniger LPS-Exposition (Vitalitätsverlust, erhöhte chemoattraktive Kapazität der Kulturüberstände und IL-8-mRNA-Expression-im Vergleich zur Kontrolle und p4-Soloexposition). In histologischen und immunhistologischen Untersuchungen (Zytokeratin und Vimentin) konnte eine Zunahme von Fibrozyten nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die Zellen des Oberflächen- und Drüsenepithels frühzeitig untergehen. Nach 48 Stunden der Inkubation waren diese Zellen zum Großteil zerstört. Dabei stellte sich heraus, dass Mastzellen in Explants bis 48 Stunden erhalten bleiben.

Entzündungsprozesse am Uterus bedingen komplexe morphologische, zytologische und funktionelle Veränderungen. Die eigenen Experimente geben wichtige Hinweise darauf, dass für die „subklinische Endometritis“ neben dem nicht obligaten Vorkommen von PMN auch Lymphozyten, Lymphozyten-Aggregate sowie in besonderem Maße Plasmazellen charakteristisch sind. In zukünftigen Experimenten sollte die „subklinische Endometritis“ als dynamisch-veränderlicher Prozess betrachtet und erforscht werden. Die in den vorliegenden histologischen und funktionellen Studien beobachteten veränderlichen Zell- und Cytokinbeteiligungen müssen auch bei der anstehenden Entwicklung praktikabler Diagnostikinstrumente in die Überlegung einbezogen werden.





## VII. SUMMARY

Successful reproduction is crucial for cost effectiveness of beef and dairy farms. High birth rates and low calving intervals are necessary for profitable business. Repeated pregnancies and births may negatively affect the uterus, which may not regenerate itself properly. Endometritis is a common illness and may occur up to 21 days post partum (p.p.) in puerperal Metritiden and from 21 days post partum in Endometritis.

This paper focuses on the Endometritis, which are again classified into three clinical patterns. The clinical Endometritis is marked by purulent or mucopurulent cervix defluxion. Pyometra differs from this by the appearance of a corpus luteum which lasts longer than 21 days. The subclinical Endometritis (sE) appears without clinical pathology and is mainly diagnosed using cytological methods. To depict histological differences between highly inflammatory illnesses and subclinical Endometritis, uteri were collected from the abattoir. The cows could be divided into three groups by examination of their historical data and the uterus diagnosis. The first group contained heifers, which were in the state of dioestrus. The second group consisted of animals which showed subclinical Endometritis or Pyometra. The third group contained animals suspected to have subclinical Endometritis due to their historical data. For histological analysis cuts were made and stained via enzymehistochemical (Naphthol-AS-D chlorine acetate Esterase) immunohistochemical (CD3, CD20, CD79a, MAC 387) and histochemical (Hämalaun-Eosin, to Giemsa, to Perls) methods.

Through histological analysis of heifer uteri and uteri which showed clinical Endometritis or Pyometra, healthy and affected uteri could be identified. Inspection of uteri from animals which were suspected of having clinical Endometritis enabled a classification of the inflammation events.

The comparison of healthy and affected uteri takes the occurrence of free cells into respect. Uteri suspected of subclinical Endometritis differed significantly from health uteri by appearance of lymphocyte aggregation and infiltration by plasma cells. These features could be determined in animals with subclinical Endometritis or Pyometra more often. The diagnosis of subclinical Endometritis was ascertained by incidence of polymorphonuclear granulocytes (PMN). PMN

could be also shown after specific coloration by Naphthol-AS-D chlorine acetate Esterase only in extremely affected organs. The subclinical Endometritis diagnosis could not be made with certainty according to this criterion.

Regarding the morphological view, the group suspected of having subclinical Endometritis revealed an increased emergence of endometrosis, fibrosis and dilated glands in comparison to heifers.

To clarify disease incidence, bacteriological and cytological checks were made with at least half of the animals. From a bacteriological standpoint, three animals from the heifer group could be proven to have low *E. coli* and streptococcus counts. Bacterial counts at all rates were found in the clinical Endometritis and Pyometra group. In the group of animals suspected to have subclinical Endometritis, bacterial low bacterial concentrations of less than 10 bacterial colonies could be detected in six of seven sampled uteri. Bacteria were identified by MALDI-TOF. No specific bacteria was found to exclusively cause Endometritis.

Concerning cytology, two of the animals suspected of having subclinical Endometritis could be diagnosed with subclinical Endometritis. No PMN was found in the cytological smear for heifers. All cytological smears of affected uteri showed a high-grade appearance of PMN.

In the second part of the study the inflammation in the uterus was analyzed using in vitro experiments. In preliminary tests a vitality analysis was established, which was based on water-soluble Tetrazolium salt. In the main test, vitality of Explants was ascertained based on PCR as well as expression of interleukin 8(IL8), NF-kB and IκB. Expression of IL8 was checked and quantified in a migration bio assay. The cells of the Explants were characterized through histological examinations. It could be shown that Lipopolysaccharide (LPS), a membrane component of *E. coli*, influences vitality. At the same time PCR and migration bio assay indicated that cells express cell-derived mediators IL8, NF-kB and IκB when the uterus is stressed.

Incubation with physiological concentrations of progesterone evoked no improvement of the culture conditions. Using these culture variants, no significant difference in vitality or stimulation with LPS were observed in comparison to the control.

Preparation of Explants were made for the histological analysis. From these preparations, immunohistochemical staining was conducted for Zytokeratin and Vimentin, as well as histochemical staining with Eosin-Hämalaun and by Giemsa. An increase of fibrocytes could not be shown. Mesenchym cells died earlier than other cells. After 48h of incubation most of these cells were destroyed; only mastcells survived up to 48 hours.

The examination of differentially inflamed and healthy uteri shows the complexity of uterus infection and underlines that PMN alone is not sufficient as a means of diagnosing uterine health. Beside morphological changes, polymorphonuclear granulocytes, lymphocytes and lymphocyte aggregates as well as plasma cells are also present, whereby plasma cells play an especially important role in this complex. Stimulation of Explants showed that stimulation had an effect on vitality, whereas progesterone did not. The improvement of explant models and in vivo experiments complement each other excellently for the analysis of subclinical Endometritis, whereby the complexity of this illness must be considered.





## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Abbondanzo SL. Paraffin immunohistochemistry as an adjunct to hematopathology. *Ann Diagn Pathol* 1999; 3: 318-27.

Adegboyega PA, Pei Y, McLarty J. Relationship between eosinophils and chronic endometritis. *Hum Pathol* 2010; 41: 33-7.

Azawi OI. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci* 2008; 105: 187-208.

Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* 2008; 69: 714-23.

Bartol FF, Roberts RM, Bazer FW, Thatcher WW. Characterization of proteins produced in vitro by bovine endometrial explants. *Biol Reprod* 1985; 33: 745-59.

Belluzzi S, Galeotti M, Eutizi CM, Castagnetti C. The correlation between mast cells and some inflammatory mediators in the bovine endometrium. *Vet Res Commun* 2004; 28 Suppl 1: 165-8.

Bisinotto RS, Santos JE. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2011; 24: 258-66.

Bohn W, Wiegers W, Beuttenmuller M, Traub P. Species-specific recognition patterns of monoclonal antibodies directed against vimentin. *Exp Cell Res* 1992; 201: 1-7.

Bondurant RH. Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci* 1999; 77 Suppl 2: 101-10.

Bonnett BN, Miller RB, Etherington WG, Martin SW, Johnson WH. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. I. Technique, histological criteria and results. *Can J Vet Res* 1991a; 55: 155-61.

Bonnett BN, Martin SW, Gannon VP, Miller RB, Etherington WG. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. III. Bacteriological analysis and correlations with histological findings. *Can J Vet Res* 1991b; 55: 168-73.

Bonnett BN, Miller RB, Martin SW, Etherington WG, Buckrell BC. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows. II. Correlations between histological criteria. *Can J Vet Res* 1991c; 55: 162-7.

Borges AM, Healey GD, Sheldon IM. Explants of intact endometrium to model bovine innate immunity and inflammation ex vivo. *Am J Reprod Immunol* 2012;

67: 526-39.

Bortz J, Schuster C (2010) Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Brandtzaeg P, Jones DB, Flavell DJ, Fagerhol MK. Mac 387 antibody and detection of formalin resistant myelomonocytic L1 antigen. J Clin Pathol 1988; 41: 963-70.

Butt BM, Senger PL, Widders PR. Neutrophil migration into the bovine uterine lumen following intrauterine inoculation with killed *Haemophilus somnus*. J Reprod Fertil 1991; 93: 341-5.

Chapwanya A, Meade KG, Doherty ML, Callanan JJ, Mee JF, O'Farrelly C. Histopathological and molecular evaluation of Holstein-Friesian cows postpartum: toward an improved understanding of uterine innate immunity. Theriogenology 2009; 71: 1396-407.

Chapwanya A, Meade KG, Narciandi F, Stanley P, Mee JF, Doherty ML, Callanan JJ, O'Farrelly C. Endometrial biopsy: a valuable clinical and research tool in bovine reproduction. Theriogenology 2010; 73: 988-94.

Cheong SH, Nydam DV, Galvao KN, Crosier BM, Gilbert RO. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. J Dairy Sci 2011; 94: 762-70.

Cobb SP, Watson ED. Immunohistochemical study of immune cells in the bovine endometrium at different stages of the oestrous cycle. Res Vet Sci 1995; 59: 238-41.

Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB, Cunha GR. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 6535-40.

Corbeil LB, Campero CM, Rhyan JC, Anderson ML, Gershwin LJ, Agnew DW, Munson L, Bondurant RH. Uterine mast cells and immunoglobulin-E antibody responses during clearance of *Tritrichomonas foetus*. Vet Pathol 2005; 42: 282-90.

Davies D, Meade KG, Herath S, Eckersall PD, Gonzalez D, White JO, Conlan RS, O'Farrelly C, Sheldon IM. Toll-like receptor and antimicrobial peptide expression in the bovine endometrium. Reprod Biol Endocrinol 2008; 6: 53.

Del Vecchio RP, Matsas DJ, Inzana TJ, Sponenberg DP, Lewis GS. Effect of intrauterine bacterial infusions and subsequent endometritis on prostaglandin F2 alpha metabolite concentrations in postpartum beef cows. J Anim Sci 1992; 70: 3158-62.

Dhaliwal GS, Murray RD, Woldehiwet Z. Some aspects of immunology of the bovine uterus related to treatments for endometritis. *Anim Reprod Sci* 2001; 67: 135-52.

Diskin MG, Parr MH, Morris DG. Embryo death in cattle: an update. *Reprod Fertil Dev* 2011; 24: 244-51.

Dohmen MJ, Joop K, Sturk A, Bols PE, Lohuis JA. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with dystocia or retained placenta. *Theriogenology* 2000; 54: 1019-32.

Donofrio G, Franceschi V, Capocéfalo A, Cavarani S, Sheldon IM. Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reprod Biol Endocrinol* 2008; 6: 65.

Donofrio G, Capocéfalo A, Franceschi V, Price S, Cavarani S, Sheldon IM. The chemokine IL8 is up-regulated in bovine endometrial stromal cells by the BoHV-4 IE2 gene product, ORF50/Rta: a step ahead toward a mechanism for BoHV-4 induced endometritis. *Biol Reprod* 2010; 83: 919-28.

Drennan WG, Macpherson JW. The reproductive tract of bovine slaughter heifers (a biometrical study). *Can J Comp Med Vet Sci* 1966; 30: 224-7.

Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Definitions and diagnosis of postpartum endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2010; 93: 5225-33.

Dudley DJ, Chen CL, Mitchell MD, Daynes RA, Araneo BA. Adaptive immune responses during murine pregnancy: pregnancy-induced regulation of lymphokine production by activated T lymphocytes. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168: 1155-63.

Eckert LO, Hawes SE, Wolner-Hanssen PK, Kiviat NB, Wasserheit JN, Paavonen JA, Eschenbach DA, Holmes KK. Endometritis: the clinical-pathologic syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 186: 690-5.

Edwards MJ. Observations on the anatomy of the reproductive organs of cows with special reference to those features sought during examination per rectum. *N Z Vet J* 1965; 13: 25-37.

Eichner R, Bonitz P, Sun TT. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J Cell Biol* 1984; 98: 1388-96.

El-Naggar AK. Methods in molecular surgical pathology. *Semin Diagn Pathol* 2002; 19: 56-71.



Engelhardt A, Jerchel D, Weidmann H, Wick H. [Synthesis, distribution and excretion of C14-marked 2-phenyl-3-methyl-tetrahydro-1, 4-oxazin (Preludin)]. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol 1958; 235: 10-8.

Eren U, Kum S, Bozkurt M, Gules O. MHC class II expression by mast cells in the genital tract of cows. Vet Res Commun 2010; 34: 405-11.

Evans AC, Walsh SW. The physiology of multifactorial problems limiting the establishment of pregnancy in dairy cattle. Reprod Fertil Dev 2011; 24: 233-7.

Figge DC. Growth characteristics of human endometrium in tissue culture. Obstet Gynecol 1960; 16: 269-77.

Fischer C, Drillich M, Odau S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C. Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. Reprod Fertil Dev 2010; 22: 818-29.

Forde N, Spencer TE, Bazer FW, Song G, Roche JF, Lonergan P. Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. Physiol Genomics 2010; 41: 53-62.

Fortier MA, Guilbault LA, Grasso F. Specific properties of epithelial and stromal cells from the endometrium of cows. J Reprod Fertil 1988; 83: 239-48.

Galeotti MBS, Volpatti D, Bergonzoni ML, D'Agaro E, Volpelli LA. Evaluation of mast cells in calf and heifer uteri. Theriogenology 1997; 48: 1301-11.

Galvao KN, Flaminio MJ, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Caixeta L, Ricci A, Guard CL, Butler WR, Gilbert RO. Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. J Dairy Sci 2010; 93: 2926-37.

Galvao KN, Santos NR, Galvao JS, Gilbert RO. Association between endometritis and endometrial cytokine expression in postpartum Holstein cows. Theriogenology 2011; 76: 290-9.

Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. Theriogenology 2005; 64: 1879-88.

Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, Spencer TE. Developmental biology of uterine glands. Biol Reprod 2001; 65: 1311-23.

Green MP, Ledgard AM, Beaumont SE, Berg MC, McNatty KP, Peterson AJ, Back PJ. Long-term alteration of follicular steroid concentrations in relation to subclinical endometritis in postpartum dairy cows. J Anim Sci 2011; 89: 3551-60.

- Grunert EdK, A.; (1999) Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind. Parey Verlag
- Herath S, Fischer DP, Werling D, Williams EJ, Lilly ST, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. Expression and function of Toll-like receptor 4 in the endometrial cells of the uterus. *Endocrinology* 2006; 147: 562-70.
- Hermanns W. Identification of osteoclasts and their differentiation from mononuclear phagocytes by enzyme histochemistry. *Histochemistry* 1987; 86: 225-7.
- Honnens A, Weisser S, Welter H, Einspanier R, Bollwein H. Relationships between uterine blood flow, peripheral sex steroids, expression of endometrial estrogen receptors and nitric oxide synthases during the estrous cycle in mares. *J Reprod Dev* 2011; 57: 43-8.
- Howard CJ, Hope JC, Villarreal-Ramos B. Contribution of in vivo and ex vivo studies to understanding the role of antigen-presenting cells and T cell subsets in immunity to cattle diseases. *Anim Health Res Rev* 2004; 5: 1-13.
- Hulkova M, Zeman J. Placental tissue as model for pilot study focused on RNA analysis from human foetal tissue. *Prague Med Rep* 2011; 112: 93-101.
- Hussain AM, Daniel RC, O'Boyle D. Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Theriogenology* 1990; 34: 291-302.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2004; 62: 9-23.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. A comparison of the cytobrush and uterine lavage techniques to evaluate endometrial cytology in clinically normal postpartum dairy cows. *Can Vet J* 2005; 46: 255-9.
- Kass L. Cytochemistry of esterases. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1979; 10: 205-23.
- Kayis SA, Atli MO, Kurar E, Bozkaya F, Semacan A, Aslan S, Guzeloglu A. Rating of putative housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in cyclic and early pregnant equine endometrium. *Anim Reprod Sci* 2011; 125: 124-32.
- Kim IH, Na KJ, Yang MP. Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *J Reprod Dev* 2005; 51: 757-64.
- König HEL, H.G.; (2011) Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer Verlag

König T (2003) Einflüsse von Glukokortikoiden und Makrophagen auf neutrophile Granulozyten im Hinblick auf die Endometritis puerperalis des Rindes. In: Tierärztliche Hochschule Hannover. Universität Hannover, Hannover

Kuther K, Audige L, Kube P, Welle M. Bovine mast cells: distribution, density, heterogeneity, and influence of fixation techniques. *Cell Tissue Res* 1998; 293: 111-9.

LeBlanc SJ, Osawa T, Dubuc J. Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology* 2011; 76: 1610-8.

Lehmann J, Ellenberger C, Hoffmann C, Bazer FW, Klug J, Allen WR, Sieme H, Schoon HA. Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *Theriogenology* 2011; 76: 1326-36.

Leipig M (2010) Untersuchungen zum Nachweis von Encephalitozoon cuniculi beim Kaninchen. In: Tierärztliche Fakultät. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Leung ST, Wathes DC. Oestradiol regulation of oxytocin receptor expression in cyclic bovine endometrium. *J Reprod Fertil* 2000; 119: 287-92.

Leung ST, Cheng Z, Sheldrick EL, Derecka K, Flint AP, Wathes DC. The effects of lipopolysaccharide and interleukins-1alpha, -2 and -6 on oxytocin receptor expression and prostaglandin production in bovine endometrium. *J Endocrinol* 2001; 168: 497-508.

Lewis GS, Thatcher WW, Bazer FW, Curl JS. Metabolism of arachidonic acid in vitro by bovine blastocysts and endometrium. *Biol Reprod* 1982; 27: 431-9.

Lewis GS. Uterine health and disorders. *J Dairy Sci* 1997; 80: 984-94.

Liebich HG (2003) Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. Schattauer Verlag

Lind M (2011) Etablierung und Anwendung einer Explantkultur der Zitze zur Analyse initialer Vorgänge bei der Mastitis des Rindes. In: Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München, München

Liszcak TM, Richardson GS, MacLaughlin DT, Kornblith PL. Ultrastructure of human endometrial epithelium in monolayer culture with and without steroid hormones. *In Vitro* 1977; 13: 344-56.

Liu Y, Yu M, Wang C, Peng K, Liu H. Distribution patterns of mast cells in the uterus of pregnant Meishan pigs. *Reprod Domest Anim* 2012; 47: 574-7.

Lojda Z, Gossrau R, Schiebler TH (1976) Enzymhistochemische Methoden.

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

Lopez C, Ajenjo N, Munoz-Alonso MJ, Farde P, Leon J, Gomez-Cimiano J. Determination of viability of human cartilage allografts by a rapid and quantitative method not requiring cartilage digestion. *Cell Transplant* 2008; 17: 859-64.

Losonsky GA, Fantry GT, Reymann M, Lim Y. Validation of a gastrointestinal explant system for measurement of mucosal antibody production. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6: 803-7.

Mann GE. Hormone control of prostaglandin F(2 alpha) production and oxytocin receptor concentrations in bovine endometrium in explant culture. *Domest Anim Endocrinol* 2001; 20: 217-26.

McDougall S, Hussein H, Aberdein D, Buckle K, Roche J, Burke C, Mitchell M, Meier S. Relationships between cytology, bacteriology and vaginal discharge scores and reproductive performance in dairy cattle. *Theriogenology* 2011; 76: 229-40.

McNaughton AP, Murray RD. Structure and function of the bovine fetomaternal unit in relation to the causes of retained fetal membranes. *Vet Rec* 2009; 165: 615-22.

Melendez P, McHale J, Bartolome J, Archbald LF, Donovan GA. Uterine involution and fertility of holstein cows subsequent to early postpartum PGF2alpha treatment for acute puerperal metritis. *J Dairy Sci* 2004; 87: 3238-46.

Miller AN, Williams EJ, Sibley K, Herath S, Lane EA, Fishwick J, Nash DM, Rycroft AN, Dobson H, Bryant CE, Sheldon IM. The effects of *Arcanobacterium pyogenes* on endometrial function in vitro, and on uterine and ovarian function in vivo. *Theriogenology* 2007; 68: 972-80.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-73.

Munoz LM, Lucas P, Holgado BL, Barroso R, Vega B, Rodriguez-Frade JM, Mellado M. Receptor oligomerization: a pivotal mechanism for regulating chemokine function. *Pharmacol Ther* 2011; 131: 351-8.

Munoz M, Corrales FJ, Caamano JN, Diez C, Trigal B, Mora MI, Martin D, Carrocera S, Gomez E. Proteome of the early embryo-maternal dialogue in the cattle uterus. *J Proteome Res* 2012; 11: 751-66.

Nash D, Lane E, Herath S, Sheldon IM. Endometrial explant culture for characterizing equine endometritis. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 105-17.



Nash DM, Sheldon IM, Herath S, Lane EA. Endometrial explant culture to study the response of equine endometrium to insemination. *Reprod Domest Anim* 2010; 45: 670-6.

Neuhoff V. Microelectrophoresis and auxiliary micromethods. *Electrophoresis* 2000; 21: 3-11.

Newby D, Marks L, Cousins F, Duffie E, Lyall F. Villous explant culture: characterization and evaluation of a model to study trophoblast invasion. *Hypertens Pregnancy* 2005; 24: 75-91.

Nolan B, Kim R, Duffy A, Sheth K, De M, Miller C, Chari R, Bankey P. Inhibited neutrophil apoptosis: proteasome dependent NF-kappaB translocation is required for TRAF-1 synthesis. *Shock* 2000; 14: 290-4.

Oliveira LJ, Hansen PJ. Deviations in populations of peripheral blood mononuclear cells and endometrial macrophages in the cow during pregnancy. *Reproduction* 2008; 136: 481-90.

Paape MJ, Bannerman DD, Zhao X, Lee JW. The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk. *Vet Res* 2003; 34: 597-627.

Paciolla M, Boni R, Fusco F, Pescatore A, Poeta L, Ursini MV, Lioi MB, Miano MG. Nuclear factor-kappa-B-inhibitor alpha (NFKBIA) is a developmental marker of NF-kappaB/p65 activation during in vitro oocyte maturation and early embryogenesis. *Hum Reprod* 2011; 26: 1191-201.

Perez-Martinez M, Luna J, Mena R, Romano MC. Lymphocytes and T lymphocyte subsets are regionally distributed in the female goat reproductive tract: influence of the stage of the oestrous cycle. *Res Vet Sci* 2002; 72: 115-21.

Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W. Evaluation of the Metrichheck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2009; 92: 5429-35.

Plontzke J, Madoz LV, De la Sota RL, Drillich M, Heuwieser W. Subclinical endometritis and its impact on reproductive performance in grazing dairy cattle in Argentina. *Anim Reprod Sci* 2010; 122: 52-7.

Randall KJ, Turton J, Foster JR. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol* 2011; 27: 267-84.

Riedmaier I, Bergmaier M, Pfaffl MW. Comparison of two available platforms for determination of RNA quality. *Biotechnol. & Biotechnol EQ.* 2010; 24: 2154-9.

Rijk JC, Bovee TF, Groot MJ, Peijnenburg AA, Nielen MW. Evidence of the indirect hormonal activity of prohormones using liver S9 metabolic bioactivation and an androgen bioassay. *Anal Bioanal Chem* 2008; 392: 417-25.

Rodenbusch S (2011) Makroskopische und histopathologische Untersuchungen am Genitaltrakt sub- und infertiler weiblicher Rinder im klinischen Kontext unter besonderer Berücksichtigung der Endometriumbiopsie. In: Veterinärmedizinische Fakultät. Universität Leipzig, Leipzig

Ross JW, Ashworth MD, Mathew D, Reagan P, Ritchey JW, Hayashi K, Spencer TE, Lucy M, Geisert RD. Activation of the transcription factor, nuclear factor kappa-B, during the estrous cycle and early pregnancy in the pig. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 39.

Runciman DJ, Anderson GA, Malmo J, Davis GM. Use of postpartum vaginoscopic (visual vaginal) examination of dairy cows for the diagnosis of endometritis and the association of endometritis with reduced reproductive performance. *Aust Vet J* 2008; 86: 205-13.

Schmauder S, Weber F, Kiossis E, Bollwein H. Cyclic changes in endometrial echotexture of cows using a computer-assisted program for the analysis of first- and second-order grey level statistics of B-Mode ultrasound images. *Anim Reprod Sci* 2008; 106: 153-61.

Schoon HAS, D.; Klug, E.; Die Endometriumbiopsie bei der Stute im klinisch-gynäkologischen Kontext. . *Pferdeheilkunde* 1997; 13

Schuler G, Wirth C, Klisch K, Pfarrer C, Leiser R, Hoffmann B. Immunolocalization of progesterone receptors in bovine placentomes throughout mid and late gestation and at parturition. *Biol Reprod* 1999; 61: 797-801.

Senosy W, Uchiza M, Tameoka N, Izaike Y, Osawa T. Impact of ovarian and uterine conditions on some diagnostic tests output of endometritis in postpartum high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2011; 46: 800-6.

Senosy WS, Uchiza M, Tameoka N, Izaike Y, Osawa T. Association between evaluation of the reproductive tract by various diagnostic tests and restoration of ovarian cyclicity in high-producing dairy cows. *Theriogenology* 2009; 72: 1153-62.

Shaham-Albalancy A, Nyska A, Kaim M, Rosenberg M, Folman Y, Wolfenson D. Delayed effect of progesterone on endometrial morphology in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 159-74.

Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H. The effect of intrauterine administration of estradiol on postpartum uterine involution in cattle. *Theriogenology* 2003; 59: 1357-71.

Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 1516-30.

Sheldon IM, Williams EJ, Miller AN, Nash DM, Herath S. Uterine diseases in cattle after parturition. *Vet J* 2008; 176: 115-21.

Sheldon IM, Price SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE. Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Domest Anim* 2009; 44 Suppl 3: 1-9.

Sheldon IM, Rycroft AN, Dogan B, Craven M, Bromfield JJ, Chandler A, Roberts MH, Price SB, Gilbert RO, Simpson KW. Specific strains of *Escherichia coli* are pathogenic for the endometrium of cattle and cause pelvic inflammatory disease in cattle and mice. *PLoS One* 2010; 5: e9192.

Singh J, Murray RD, Mshelia G, Woldehiwet Z. The immune status of the bovine uterus during the peripartum period. *Vet J* 2008; 175: 301-9.

Smith M, Hagerty KA, Skipper B, Bocklage T. Chronic endometritis: a combined histopathologic and clinical review of cases from 2002 to 2007. *Int J Gynecol Pathol* 2010; 29: 44-50.

Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bazer FW. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. *Biol Reprod* 2004; 71: 2-10.

Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review. *Shock* 2002; 18: 99-106.

Szostek AZ, Siemieniuch MJ, Lukasik K, Galvao AM, Ferreira-Dias GM, Skarzynski DJ. mRNA transcription of prostaglandin synthases and their products in the equine endometrium in the course of fibrosis. *Theriogenology* 2012; 78: 768-76.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-20.

Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 574398.

Tang W, Hu Z, Muallem H, Gulley ML. Quality assurance of RNA expression profiling in clinical laboratories. *J Mol Diagn* 2012; 14: 1-11.

Tibary A, Fite C, Anouassi A, Sghiri A. Infectious causes of reproductive loss in camelids. *Theriogenology* 2006; 66: 633-47.

Ulbrich SE, Meyer SU, Zitta K, Hiendleder S, Sinowatz F, Bauersachs S, Buttner M, Frohlich T, Arnold GJ, Reichenbach HD, Wolf E, Meyer HH. Bovine endometrial metalloproteinases MMP14 and MMP2 and the metalloproteinase inhibitor TIMP2 participate in maternal preparation of pregnancy. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 332: 48-57.

Vesterinen EH, Nedrud JG, Collier AM, Walton LA, Pagano JS. Explantation and subculture of epithelial cells from human uterine ectocervix. *Cancer Res* 1980; 40:

512-8.

Vollmerhaus B. Die zyklischen Veränderungen des Endometriums beim Rind. Dtsch Tierärztl Wochenschr 65. 461-465. 1958;

Walker RA. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. Histopathology 2006; 49: 406-10.

Wang CK, Robinson RS, Flint AP, Mann GE. Quantitative analysis of changes in endometrial gland morphology during the bovine oestrous cycle and their association with progesterone levels. Reproduction 2007; 134: 365-71.

Werling D, Piercy J, Coffey TJ. Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? Vet Immunol Immunopathol 2006; 112: 2-11.

Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, Heuwieser W. A clinical approach to determine false positive findings of clinical endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. Theriogenology 2010; 74: 1248-55.

Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. Chembiochem 2003; 4: 1120-8.

Yang W, Zerbe H, Petzl W, Brunner RM, Gunther J, Draing C, von Aulock S, Schuberth HJ, Seyfert HM. Bovine TLR2 and TLR4 properly transduce signals from Staphylococcus aureus and E. coli, but S. aureus fails to both activate NF-kappaB in mammary epithelial cells and to quickly induce TNFalpha and interleukin-8 (CXCL8) expression in the udder. Mol Immunol 2008; 45: 1385-97.

Zarzynska J, Motyl T. Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland. J Physiol Pharmacol 2008; 59 Suppl 9: 275-88.

Zerbe H, Schneider N, Leibold W, Wensing T, Kruip TA, Schuberth HJ. Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver. Theriogenology 2000; 54: 771-86.

Zerbe H, Schuberth HJ, Engelke F, Frank J, Klug E, Leibold W. Development and comparison of in vivo and in vitro models for endometritis in cows and mares. Theriogenology 2003; 60: 209-23.





## **IX. ANHANG**

### **1. Lösungen für die histologische, immune und enzymhistologische Untersuchungen**

#### **1.1. Fixiermedium**

##### **Gepuffertes Paraformaldehyd**

###### **Lösung A**

500ml A. dest. werden für 5 min in der Mikrowelle erhitzt, danach Zugabe von

- 40g Paraformaldhyd
- 0,735g Calciumchlorid-Dihydrat

Weiteres Erhitzen und Rühren unter Zugabe einiger ml 1N NaOH bis die Lösung klar ist.

###### **Lösung B**

Herstellung des Cacodylatpuffers:

- 10,7g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Applichem, Darmstadt, Nr.A2140)
- 4,15ml 1N Salzsäure (Applichem, Darmstadt, Nr.A1434)
- 500ml A. dest.

Die Lösungen werden zusammengefügt und der pH-Wert auf 7,2 eingestellt

##### **Formalin**

Es wurde ein gebrauchsfertiges neutral gepuffertes Formalin (4 %) (SAV, Flintsbach, Nr.: FN10 000-4-1) verwendet.

#### **1.2. Lösungen für die Färbung der Paraffinschnitte**

##### **70%iges Ethanol**

- 7000 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit
- 2600 ml A. dest. mischen.

**Hämalaun-Lösung**

Hämalaun-Lösung nach Mayer (Applichem, Darmstadt, Nr. A0884)

**0,5%ige HCl-Ethanol-Lösung**

- 100 ml 1%ige-HCl-Ethanol-Lösung mit
- 100 ml 70%igem Ethanol mischen.

**Eosin-Lösung**

- 10 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in
- 1000 ml erhitztem A. dest. lösen. Danach
- 1,5 ml 100%igen Eisessig (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) hinzugeben und filtrieren.

**Färbung nach Giemsa****7%ige Giemsa-Gebrauchslösung**

- 97,5 ml di-Kaliumhydrogenphosphat 1,361 g in 100 ml A. dest. (Applichem, Darmstadt, Nr. A3620)
- 2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 1,419 g in 100 ml A. dest. (Merck, Darmstadt, Nr. 1.01960)
- Mischen und Erwärmen (80°C)
- 7 ml Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09204) hinzugeben.
- Auf einen pH-Wert von 5,0 einstellen und filtrieren.

**0,5%ige Essigsäure**

- 5 ml 100%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0820) in
- 995 ml A. dest. lösen.

**1.3. Lösungen für die Immunhistochemie****Wasserstoffperoxid-Lösungen****1%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung**

- 6 ml 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) in
- 174 ml A. dest. lösen

**2%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung**

- 12 ml 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) in
- 168 ml A. dest. lösen.

**5%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung**

- 36 ml 30%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) in
- 150 ml A. dest. lösen.

**50 mM Tris-Buffer-Saline (TBS) pH 7,6**

- 60,5 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5670)
- 700 ml A. dest.
- 90 g NaCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 1230)
- 2 N HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 5150)

Tris-Hydroxymethylaminomethan in A. dest. lösen und mit HCl auf einen pH-Wert von 7,6 einstellen. Mit A. dest. auf 1000 ml auffüllen und pH-Wert überprüfen. NaCl lösen und pH-Wert überprüfen.

Für die Gebrauchslösung 1:10 mit A. dest. verdünnen und auf einen pH-Wert von 7,6 einstellen.

**DAB-Gebrauchslösung**

- 10 mg 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-dihydrat-Tablette (Biotrend, Köln, Nr. 4170)
- 10 ml A. dest.

Tablette in A. dest. lösen, filtrieren und im Dunkeln aufbewahrt (-21°C)

Vor Gebrauch mit 1 µl 30%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (neoLab, Heidelberg, Nr. 1185) pro 1 ml DAB-Lösung versetzen.

**0,01 M Citratpuffer pH 6,0**

- 4,2 g Citrat-Monohydrat (neoLab, Heidelberg, Nr. 4345)
- 2000 ml A. dest.
- 2 N NaOH (neoLab, Heidelberg, Nr. 5630)

Citrat-Monohydrat in A. dest. lösen und mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,0 einstellen.



**Tris/EDTA-Puffer pH 9,0**

- 2,42 g Tris-Hydroxymethylaminomethan ultrapure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5670)
- 2000 ml A. dest.
- 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. E-5134)
- 1 M HCl (neoLab, Heidelberg, Nr. 2806)

Tris-Hydroxymethylaminomethan und EDTA in A. dest. lösen und mit HCl auf einen pH-Wert von 9,0 einstellen.

**1.4. Verwendete Antikörper****Tab. 11: Verwendete Antikörper, Herstellernachweis, Konzentrationen**

Zielzellen der Primärantikörper	Primär-antikörper	Tierart	Konz.	Sekundär-antikörper	Tierart	Konz.
CD3 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten	Dako No. A045201	Kaninchen	1:100	Vector Labs BA-1000	Ziege	1:200
CD20 <sup>+</sup> -B-Lymphozyten	LabVision RB-9013-P	Kaninchen	1:400	Vector Labs BA-1000	Ziege	1:200
CD79a <sup>+</sup> -B-Lymphozyten	Dako No. M7051	Maus	1:20	Dako No. E0433	Ziege	1:200
Macrophagen (Mac387)	Dako No. M0747	Maus	1:300	Dako No. P0161	Kaninchen	1:100
Macrophagen (CD68)	Dako No. M0876	Maus	1:50	Dako No. E0433 Dako No. P0161	Ziege Kaninchen	1:200 1:100
			1:100			
			1:200			
Zytokeratin	Dako No. M3515	Maus	1:50	Dako No. P0161	Kaninchen	1:100
Vimentin	Dako No. M0725	Maus	1:300	Dako No. P0161	Kaninchen	1:100

**1.5. Lösungen für die Herstellung von Kunststoffschnitten****Lösung A**

- 196mg Benzolperoxidin (8.01641.1000)
- 10ml Methylmetacrylat(8.00590.1000)
- 30ml 2-Hydroxy-Methylmetacrylat (8.00588.0250)
- 8ml Etylenglykol-Monobutylether (8.01544.1000)
- 1ml Polyethylenglykol (8.17003.5000)

## **Spülflüssigkeit für das Autotechnikon**

Herstellung des Cacodylatpuffers:

- 16,5g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat Applichem, Darmstadt, Nr.A2140)
- 6,23ml 1N Salzsäure (Applichem, Darmstadt, Nr.A1434)
- 1500ml A. dest

Anschließend den pH-Wert auf 7,2 einstellen

- 105g D(+)-Saccharose
- 1,105g Calciumchlorid-Dihydrat

## **Einbettungsmedium Lösung A**

- 60 ml Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (Merck, Darmstadt, Nr. 8.00588) mit
- 20 ml Methacrylsäuremethylester (Merck, Darmstadt, Nr. 8.05900),
- 16 ml Ethylenglykolmonobutylether (Merck, Darmstadt, Nr. 8.01554) und
- 2 ml Polyethylenglykol 400 (Merck, Darmstadt, Nr. 8.17003) mischen und 338 mg Benzoylperoxid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 517909-500G) darin lösen

## **1.6. Lösungen für die Färbung der Kunststoffsnitte**

### **Hämalaun-Eosin-Phloxin-Färbung**

#### **1%ige HCl-Ethanol-Lösung**

- 10 ml 25%ige Salzsäure (neoLab, Heidelberg, Nr. 5030) mit
- 700 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) und
- 250 ml A. dest. mischen.

#### **Stammlösung Eosin (SE)**

- 1,0 g Eosin G (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in
- 1000 ml A. dest. lösen.

#### **Stammlösung Phloxin (SP)**

- 1,0 g Phloxin (Merck, Darmstadt, Nr. 15926) in
- 1000 ml A. dest. lösen.

**Eosin-Pheloxin-Gebrauchslösung**

- 468 ml 96%iges Ethanol (BfB, Offenbach/Main, Nr. 0641) mit
- 30 ml SE und
- 3 ml SP sowie
- 2,4 ml 96%ige Essigsäure (Applichem, Darmstadt, Nr. A0458) mischen und anschließend filtrieren.

**Färbung nach Giemsa****7%ige Giemsa-Gebrauchslösung**

- 97,5 ml di-Kaliumhydrogenphosphat 1,361 g in 100 ml A. dest. (Applichem, Darmstadt, Nr. A3620)
- 2,5 ml Natriumhydrogenphosphat 1,419 g in 100 ml A. dest. (Merck, Darmstadt, Nr. 1.01960)
- Mischen und Erwärmen (80°C)
- 7 ml Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09204) hinzugeben.
- Auf einen pH-Wert von 5,0 einstellen und filtrieren

**Färbung nach Perls**

- 2g Kalihexacyanoferrat (II)-Trihydrat (Merck, Darmstadt, Nr 4984)
- 2 ml 37%ige Salzsäure
- 100ml A.dest

**1.7. Lösung für die Enzymhistochemie****Veronal Acetat-Puffer**

- 2,94g 5,5-Diäthylbarbitursäure Natriumsalz (Marck 6318)
- 1,94g Natriumacetat
- A. dest.

**Phosphat-Puffer für Enzym-Reaktionen****Lösung A (0,1M)**

- 13,61g Kaliumdihydrogenphosphat (Merck 1.06580.1000)
- 1000ml A. dest.

**Lösung B (0,1M)**

- 17,80g Dinatriumhydrogenphosphat (Merck 1.04873.1000)
- 1000ml A. dest.

**Naphthol-AS-D Chloracetat Esterase (CAE)**

- 0,5 ml 4%-iges Natriumnitrit (wässrig) (Merck Nr 6549)
- 0,5 ml 4%-iges Parafuchsin (Fluka Nr. 76248)
- 80 ml 0,1M Phosphatpuffer
- 6 mg Naphthol-AS-Acetat (Sigma Nr. N 0758)
- 2,5 ml N,N-Dimethylformamid (Merck Nr. 822275)

**Peroxidase**

- 25 mg 3,3-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) (Biotrend, Köln, Nr. 4170)
- 50 ml PBS-Puffer
- 20ml Wasserstoffperoxid 30%-ig

**Saure Phosphatase**

- 0,5 ml 4%-iges Natriumnitrit (wässrig) (Merck Nr 6549)
- 0,5 ml 4%-iges Parafuchsin (Fluka Nr. 76248)
- 80 ml Veronal-Acetat-Puffer (s.o.)
- 25 mg Naphthol-AS-BI-Phosphat (Sigma Nr. N 2250)
- 1 ml N,N-Dimethylformamid (Merck Nr. 822275)

**a-Naphtyl-Acetat Esterase (ANA)**

- 0,5 ml 4%-iges Natriumnitrit (wässrig) (Merck Nr 6549)
- 0,5 ml 4%-iges Parafuchsin (Fluka Nr. 76248) oder Fast Garnet (Sigma F0875)
- 80 ml 0,1M Phosphatpuffer
- 125 mg a-Naphtyl-Acetat (Serva Nr. 30 040)
- 5 ml Ethylglykolmonomethylether (Serva Nr. 11 31)



### 1.8. Protokoll der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte und Einzelergebnisdarstellung

**Tab. 12: Protokoll zur semiquantitativen Auswertung der Histologischen Schnitte, in den Kästchen wurden mittels Strichliste die beobachteten Merkmale zeitgleich zum Mikroskopieren festgehalten**

Uterus Nr.:				rechtes Horn	linkes Horn				
Epithel				Interstitium					
Höhe	hoch	iso	platt	Höhe	2,5	10	40		
Läsionen	ja	nein		glandulärer Teil					
Nekrose	ja	nein		Drüsenzelle	hoch	iso	platt		
Mehrreihigkeit	ja	nein		Lumenvolumen	<	>	(=)		
Mitosen	ja	nein		im interglandulären Interstitium					
	intra	sub	lumen		Ge- faß	Drüse	Inter	d	h
Lymphozyten				Lymphozyten					
Mastzellen				Neutrophile					
Neutrophile				Mastzellen					
Eosinophile				Eosinophile					
Dilatierte Drüsen Interstitium:			ja	Siderophage					
umgebende Fibrosierung	ja	nein		Plasmazellen					
Anzahl				Lymphspalt	hoch	mittel	tief	keine	
Epithelhöhe	hoch	iso	platt	Lymphozyten- ansammlungen	ja	nein			
Sonstiges am Interstitium:				Lymphfollikel	ja	nein			
				Ödematisierung	ja	nein			
				Zellen im Uterus lumen	ja	nein			
				Zellen im Drüsenlumen	ja	nein			

**Tab. 13: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte für die Merkmale Epithel Höhe und Läsionen**

	Epithel Merkmal Höhe						Epithel Merkmal Läsionen	
	hochprismatisch		isoprismatisch		flach		ja	nein
	ja	nein	ja	nein	ja	nein		
Gruppe 1 ( n )	116	12	12	116	0	128	2	126
Gruppe 2 ( n )	46	70	42	74	24	92	71	45
Gruppe 3 ( n )	133	35	29	139	0	168	7	161
Gruppe 1 (%)	91	9	9	91	0	100	2	98
Gruppe 2 (%)	40	60	36	64	21	79	61	39
Gruppe 3 (%)	79	21	17	83	0	100	4	96
	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.
alle Grp.	≤0,001	67,71	≤0,001	23,46	≤0,001	37,670	≤0,001	129,41
Grp1 vs. Grp2	≤0,001	15,17	≤0,001	0,18	≤0,001	0,040	≤0,001	0,01
Grp1 vs. Grp3	0,017	2,69	0,090	0,48	1,000	1,000	0,400	0,49
Grp2 vs. Grp3	≤0,001	0,18	0,002	2,75	≤0,001	26,630	≤0,001	37,54

**Legende:** n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi²/OddsR. = Chi²-Testgrößen der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche

**Tab. 14: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte für die Merkmale Dilatierte Drüsen**

	Dilatierte Drüsen Interstitium											
	umgebende Fibrosierung				Epithelhöhe							
	ja	nein	ja	nein	hochprismatisch	ja	nein	ja	nein	isoprismatisch	ja	nein
Gruppe 1 ( n )	10	116	0	126	0	126	116	10	126	0	126	126
Gruppe 2 ( n )	80	24	16	88	15	68	16	64	53	30	30	30
Gruppe 3 ( n )	67	101	20	86	16	90	51	55	2	104	2	104
Gruppe 1 (%)	8	92	0	100	0	100	92	8	0	100	0	100
Gruppe 2 (%)	77	23	15	85	18	82	20	80	64	36	64	36
Gruppe 3 (%)	40	60	19	81	15	85	48	52	2	98	2	98
	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.
alle Grp.	≤0,001	92,81	≤0,001	20,16	0,000	19,00	≤0,001	105,86	≤0,001	154,31	≤0,001	154,31
Grp1 vs. Grp2	≤0,001	0,03	≤0,001	0,00	≤0,001	0,05	≤0,001	46,00	≤0,001	0,03	≤0,001	0,03
Grp1 vs. Grp3	≤0,001	0,13	0,050	≤0,001	0,002	0,07	≤0,001	12,46	0,150	0,00	0,150	0,00
Grp2 vs. Grp3	≤0,001	4,93	0,500	0,79	0,500	1,24	0,000	0,27	≤0,001	87,11	≤0,001	87,11

**Legende:** n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi²/OddsR. = Chi²-Testgrößen der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche

**Tab. 15: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte für die Merkmale Lymphozyten**

	Interstitium Merkmal Lymphozyten												Epithel Merkmal Lymphozyten			
	gefäßassoziiert			drüsenassoziiert			diffus verteilt			herdförmig angeordnet			intraepithelial		subepithelial	
	ja	nein		ja	nein		ja	nein		ja	nein		ja	nein	ja	nein
Gruppe 1 ( n )	0	128		16	112		128	0		0	128		128	0	122	6
Gruppe 2 ( n )	87	29		116	0		116	0		0	116		111	5	111	5
Gruppe 3 ( n )	0	168		47	121		160	5		4	164		151	17	163	5
Gruppe 1 (%)	0	100		13	87		100	0		0	100		100	0	95	5
Gruppe 2 (%)	75	25		100	0		100	0		0	100		96	4	96	4
Gruppe 3 (%)	0	100		28	72		97	3		2	98		90	10	97	3
	p-values	Chi²/OddsR.		p-values	Chi²/OddsR.		p-values	Chi²/OddsR.		p-values	Chi²/OddsR.		p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.
alle Grp.	0,001	229,49		0,001	178,00		0,440	1,63		0,133	4,63		0,012	8,84	0,700	0,52
Grp1 vs. Grp2	≤0,001	≤0,001		≤0,001	0,00		1,000	1,00		1,000	1,00		0,170	4,13	0,733	0,79
Grp1 vs. Grp3	1,000	1,00		≤0,001	0,25		0,600	7,53		0,155	0,00		0,005	11,00	0,470	0,59
Grp2 vs. Grp3	≤0,001	≤0,001		0,004	0,25		0,600	7,53		0,155	0,00		0,900	2,67	0,470	0,59

**Legende:** n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi²/OddsR. = Chi²-Testgrößen der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche



**Tab. 16: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte Neutrophile Granulozyten**

	Interstitium Merkmal Neutrophile										Epithel Merkmal Neutrophile			
	gefäßassoziiert		drüsenassoziiert		diffus verteilt		herdförmig angeordnet		intraepithelial		subepithelial			
	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein		
Gruppe 1 (n)	2	126	0	128	0	128	0	128	0	128	1	127		
Gruppe 2 (n)	65	51	106	10	116	0	0	116	111	5	111	5		
Gruppe 3 (n)	2	166	0	168	29	139	0	168	12	156	12	156		
Gruppe 1 (%)	2	98	0	100	0	100	0	100	0	100	1	99		
Gruppe 2 (%)	56	44	91	9	100	0	0	100	96	4	96	4		
Gruppe 3 (%)	1	99	0	100	17	83	0	100	7	93	7	93		
	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.		
alle Grp.	≤0,001	125,37	≤0,001	252,45	≤0,001	232,37	1,000	1,00	≤0,001	254,09	≤0,001	249,93		
Grp1 vs. Grp2	≤0,001	0,02	≤0,001	0,00	≤0,001	0,00	1,000	1,00	≤0,001	0,00	≤0,001	0,00		
Grp1 vs. Grp3	0,560	2,02	1,000	1,00	≤0,001	0,05	1,000	1,00	0,007	0,00	0,030	0,13		
Grp2 vs. Grp3	≤0,001	126,00	≤0,001	1001,00	≤0,001	483,35	1,000	1,00	≤0,001	318,86	≤0,001	318,86		

**Legende:** n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi²/OddsR. = Chi²-Testgröße in der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche

**Tab. 17: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte für die Merkmale Mastzellen**

	Interstitium Merkmal Mastzellen										Epithel Merkmal Mastzellen			
	gefäßassoziiert		drüsenassoziiert		diffus verteilt		herdförmig angeordnet		intraepithelial		subepithelial			
	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein		
	p-values	Chr <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chr <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chr <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chr <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chr <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chr <sup>2</sup> /OddsR.		
Gruppe 1 ( n )	1,000	1,00	1,000	1,00	0,960	0,08	1,000	1,00	0,001	31,58	0,001	25,85		
Gruppe 2 ( n )	1,000	1,00	1,000	1,00	0,810	1,12	1,000	1,00	≤0,001	0,06	≤0,001	2,67		
Gruppe 3 ( n )	1,000	1,00	1,000	1,00	0,810	1,12	1,000	1,00	1,000	1,00	≤0,001	4,33		
Gruppe 1 ( % )	1,000	1,00	1,000	1,00	1,000	1,00	1,000	1,00	≤0,001	17,47	0,110	1,62		
Gruppe 2 ( % )														
Gruppe 3 ( % )														
alle Grp.														
Grp1 vs. Grp2														
Grp1 vs. Grp3														
Grp2 vs. Grp3														

**Legende:** n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi²/OddsR. = Chi²-Testgrößen der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche

**Tab. 18: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte für die Merkmale Eosinophile Granulozyten und Siderophagen**

	Interstitium Merkmal Eosinophile							
	gefäßassoziiert		drüsenassoziiert		diffus verteilt		herdförmig angeordnet	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Gruppe 1 ( n )	0	128	0	128	23	105	0	128
Gruppe 2 ( n )	6	110	6	110	82	34	1	115
Gruppe 3 ( n )	0	168	0	168	11	157	0	168
Gruppe 1 (%)	0	100	0	100	18	82	0	100
Gruppe 2 (%)	5	95	5	95	71	29	1	99
Gruppe 3 (%)	0	100	0	100	7	93	0	100
	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.
alle Grp.	0,096	4,68	0,120	4,41	≤0,001	107,63	0,770	0,51
Grp1 vs. Grp2	0,097	0,19	0,097	0,19	≤0,001	0,09	0,560	0,49
Grp1 vs. Grp3	1,000	1,00	1,000	1,00	0,019	2,92	1,000	1,00
Grp2 vs. Grp3	0,097	5,21	0,097	5,21	≤0,001	32,53	0,560	2,02
	Intertium Merkmal Siderophage							
	gefäßassoziiert		drüsenassoziiert		diffus verteilt		herdförmig angeordnet	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Gruppe 1 ( n )	0	128	0	128	3	125	1	127
Gruppe 2 ( n )	6	110	6	110	96	20	9	107
Gruppe 3 ( n )	0	168	1	167	49	119	2	166
Gruppe 1 (%)	0	100	0	100	2	98	1	99
Gruppe 2 (%)	5	95	5	95	83	17	8	92
Gruppe 3 (%)	0	100	1	99	29	71	1	99
	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.	p-values	Chi <sup>2</sup> /OddsR.
alle Grp.	0,096	4,68	0,096	4,68	≤0,001	144,40	0,006	10,14
Grp1 vs. Grp2	0,097	0,19	0,097	0,19	≤0,001	0,00	0,017	0,12
Grp1 vs. Grp3	1,000	1,00	1,000	1,00	≤0,001	0,05	1,000	1,00
Grp2 vs. Grp3	0,097	5,21	0,097	5,21	≤0,001	11,95	0,017	8,61

**Legende:** n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi<sup>2</sup>/OddsR. = Chi<sup>2</sup>-Testgrößen der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche

**Tab. 19: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte für die Merkmale Plasmazellen und Lymphspalten**

	Interstitium Merkmal Plasmazellen							
	gefäßassoziiert		drüsenassoziiert		diffus verteilt		herdförmig angeordnet	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Gruppe 1 ( n )	0	128	12	116	107	21	0	128
Gruppe 2 ( n )	6	110	6	110	110	6	29	87
Gruppe 3 ( n )	0	168	0	168	150	18	7	161
Gruppe 1 (%)	0	100	9	91	84	16	0	100
Gruppe 2 (%)	5	95	5	95	95	5	25	75
Gruppe 3 (%)	0	100	0	100	89	11	4	96
	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.
alle Grp.	0,096	4,68	0,034	6,74	0,041	6,37	≤0,001	38,00
Grp1 vs. Grp2	0,097	0,19	0,270	1,88	0,010	0,28	≤0,001	0,03
Grp1 vs. Grp3	1,000	1,00	0,009	9,79	0,300	0,65	0,170	0,24
Grp2 vs. Grp3	0,097	5,21	0,097	5,21	0,120	2,35	≤0,001	8,00
	Interstitium Merkmal Lymphspalten							
	Segment B		Segment C		Segment D		keine	
	ja	nein	ja	nein	ja	nein	ja	nein
Gruppe 1 ( n )	14	114	105	23	11	117	24	76
Gruppe 2 ( n )	0	116	5	111	5	111	106	10
Gruppe 3 ( n )	16	152	137	31	104	64	34	66
Gruppe 1 (%)	11	89	82	18	9	91	19	81
Gruppe 2 (%)	0	100	4	96	4	96	91	9
Gruppe 3 (%)	10	90	82	18	62	38	20	80
	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.	p-values	Chi²/OddsR.
alle Grp.	0,010	8,93	≤0,001	164,61	≤0,001	104,02	≤0,001	138,81
Grp1 vs. Grp2	0,003	12,24	≤0,001	109,33	0,420	1,55	≤0,001	0,02
Grp1 vs. Grp3	0,817	1,11	1,000	1,00	0,000	0,06	0,860	0,94
Grp2 vs. Grp3	0,005	0,09	≤0,001	0,01	0,000	0,04	≤0,001	40,44

**Legende:** n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi²/OddsR. = Chi²-Testgrößen der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche

Tab. 20: Nachweis zur Datenerhebung und statistischen Auswertung der semiquantitativen Auswertung histologischer Schnitte für die Merkmale Lymphozytenansammlungen, Lymphfollikel, Ödematisierung und Zellen im Uterus-/Drüsenlumen

	Interstitialium Merkmal											
	Lymphozyten-ansammlungen			Lymphfollikel			Ödematisierung			Zellen im Uteruslumen		
	ja	nein		ja	nein		ja	nein		ja	nein	Zellen im Drüsenlumen
Gruppe 1 ( n )	2	126		1	127		39	89		0	128	0
Gruppe 2 ( n )	31	85		4	112		85	31		88	28	76
Gruppe 3 ( n )	18	150		5	163		21	146		14	154	12
Gruppe 1 (%)	2	98		1	99		30	70		0	100	0
Gruppe 2 (%)	27	73		3	97		73	27		76	24	66
Gruppe 3 (%)	11	89		3	97		13	87		8	92	7
	p-values	Chi²/OddsR.		p-values	Chi²/OddsR.		p-values	Chi²/OddsR.		p-values	Chi²/OddsR.	
alle Grp.	≤0,001	27,75		0,550	1,17		≤0,001	80,65		≤0,001	169,05	≤0,001
Grp1 vs. Grp2	≤0,001	0,06		0,312	0,33		≤0,001	0,16		≤0,001	0,00	≤0,001
Grp1 vs. Grp3	0,010	0,17		0,312	0,33		0,003	2,87		0,017	0,12	0,030
Grp2 vs. Grp3	0,004	2,99		1,000	1,00		≤0,001	18,09		≤0,001	36,42	≤0,001
												25,79

Legende: n =Anzahl der beobachteten Merkmale; % = prozentualer Anteil vorhandener bzw. nicht vorhandener Merkmale; alle Grp. = statistische Berechnungen unter Berücksichtigung aller Gruppen; Chi²/OddsR. = Chi²-Testgrößen der Zeile „alle Grp.“ und Wert der Odds Ratio in den Zeilen der einzelnen Gruppen Vergleiche



## 1.9. Protokolle, Lösungen und Nährböden für die bakteriologische Untersuchung

**Tab.13: Protokoll zur Auswertung bakteriologischer Ausstriche in einer Kulturplatte**

Befundung	Wert	Menge des Kolonientyps im Primärausstrich (100µl)
-	0,00	kein Wachstum im Primärausstrich
(+)	0,5	eine bis 10 Kolonien
+	1	11 – ca. 20 Kolonien
++	2	dicht stehende Kolonien im 1., einzelnstehende im 2. Impfstrich
+++	3	dicht stehende Kolonien im 2., einzelnstehende im 3. Impfstrich
++++	4	dicht stehende Kolonien im 3. Impfstrich

### Herstellung der Nährböden

- Die Vormischungen wurden laut Herstellerangaben in A. dest. Gelöst und 50ml Schafblut zu 1l Lösung gegeben
- Ausplattieren in einmal Petrischalen
- Autoklavieren 125°C für 15min

### Herstellung der Matrix-Lösung

#### Herstellung der Organic Solvent – Lösung (OS):

- 500µl Acetonitril (Fluka 101096056)
- 475µl A. dest.,
- 25µl reine Trifluoressigsäure (Merck 1.08178.0050)

#### Herstellung der Matrix:

- je 1ml Matrix-Lösung 14mg Zimtsäure (Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic acid[Sigma 28166-41-8]) mit 1ml OS in Lösung bringen
- Lösung 2min bei max. Umdrehung zentrifugieren

## **Lösung zur Reinigung eines Targets**

### **70% wässrige Ethanol-Lösung**

- Für 100ml Lösung: 30ml de-ionisiertes Wasser in einen Messzylinder und dann in einen Becher gießen
- 70 ml Ethanol abmessen und mit dem de-ionisierten Wasser mischen, indem die Flüssigkeit 5mal vom Becher in den Messzylinder und zurückgeschüttet wird

### **80% wässrige Trifluoressigsäure**

- 50µl de-ionisiertes Wasser in ein Eppendorf-Röhrchen geben
- 200µl 100 %ige Trifluoressigsäure dazugeben.
- 1 Minute im Vortex mischen

## **1.10. Lösungen für die Zytologie**

### **Färbelösung**

- Eosin-Methylenblau Lösung nach Wright (Merck 1383)

### **1%iges HCL**

- 10ml 25%ige Salzsäure (Applichem A0658)
- 700ml 96%ige Äthanol
- 250ml A. dest

## **2. Lösungen und Medien für die Simulations- und Supplementationsversuche**

### **2.1. Lösungen für Versuche mit Explants**

#### **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)**

Die PBS (Phosphate-buffered Saline)-Trockensubstanz (siehe III.1.4) setzt sich aus den genannten Bestandteilen in den folgenden Konzentrationen zusammen:

- NaCl 8,0 g
- KCl 1,24 g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g

Die Trockensubstanz wurde in 1000 ml A. tridest. gelöst. Der Puffer hatte einen pH-Wert von 7,4. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C

#### **Medium zur Explant Kultivierung**

- 500ml DMEM, Ham-F12 (Sigma Nr. 6421)
- 5ml Anti Anti (Gibco, life Technologies)

#### **Progesteron**

- Progesteron (Sigma Nr. P6149) wird in 1ml Äthanol gelöst
- anschließend werden 49ml Medium hinzugegeben
- herstellen von 0,5ml Aliquots 0,2mg/ml und lagern bei -21°C
- vor Verwendung in einer Verdünnungsreihe auf 5ng/ml verdünnen

#### **LPS**

- LPS (Sigma Nr. L6529) in Medium lösen
- Herstellung von 0,5ml Aliquots 1000ng/ml und lagern bei -21°C
- vor Verwendung in einer Verdünnungsreihe auf 3µg/ml verdünnen

## **2.2. Lösungen für die Molekularbiologische Arbeit**

### **Lösungen für die Durchflusszytometrie**

Nach den Anweisungen des Herstellers wurde das Messkanalsystem des Durchflusszytometers nach den Messungen mit 2 ml der Cleaning Solution (Accuri Cytometers Inc., Großbritannien) und anschließend mit 2 ml sterilfiltriertem A. tridest. gespült.

### **Lösungen für die PCR**

Die Waschlotionen für die RNA-Präparation wurden gemäß Herstellerangaben in 96%igem Äthanol gelöst.

Der Puffer und das Gel für die Microelektrophorese wurden gemäß Herstellerangaben verwendet.

Primer wurden nach ihrem Molekulargewicht zu 200ng/ml mit A. dest. verdünnt.

### 3. Herstellernachweis der verwendeten Geräte und

#### 3.1. Geräte

Adhesive seal roller	(4titude, Berlin)
Ausgießstation TBS 88 Paraffin Embedding System	(Medite Medizintechnik, Burgdorf)
Autoklav „D65“	(Systec, Wettenberg)
Brutschrank I für Mikrobiologie	(Memmert, Schwabach)
Dampfsterilisator „Varioklav®“	(H+P Labortechnik – Thermo Scientific, München)
Einbettungsautomaten „Histomaster 2050/DI“	(Bavimed, Birkenau)
Eismaschine „ZBE 70-35“	(Ziegra, Isernhagen)
Experion	(Biorad, Merck, USA)
Fluoreszenz-Durchflusszytometer, Modell Accuri C6 Flow Cytometers, mit Software CFlow®	(Accuri Cytometers Inc., Großbritannien)
Forma series 2 water Jacketed CO <sub>2</sub> Incubators	(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)
Kryo-Boxen aus Plastik	(Zefa, Harthausen)
Kühlzentrifuge „Rotina 420 R“	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
Kühlzentrifuge „Rotina 50 RS“	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
Laborgasbrenner mit automatischer Zündung „Gasprofi 2 SCS“	(WLD-TEC GmbH, Göttingen)
Laborglasflaschen mit Gewinde Schott (500 ml, 1000 ml, 2000 ml) Duran®	(Schott, Mainz)
Labor-pH-Meter „Piccolo®plus“ HI 1295	(HANNA instruments, Inc., Woonsocket, RI, USA)
Laborwaage „PLJ 360-3M“	(Kern & Sohn, Bahlingen)
Laborwaage „Sartorius laboratory“	(Sartorius GmbH, Göttingen)
McIllwain Tissue Chopper	(Gala Instruments, Bad Schwallbach)
Mikrowellenherd „MG-3837“	(LG Electronics Deutschland GmbH, Willich)
Multipette	(Eppendorf, Hamburg)



Nanophotometer Pearl	(Implen, München)
Photometer "Spectra Mini"	(Tecan, Crailsheim)
Pipettierhilfe „accu-jet®“	(Brand, Wertheim)
Polycarbonatmembran 25 x 80 mm, Porengröße 3 µm	(NeuroProbe, Gaithersburg, USA)
Reinstwassersystem „GenPure“	(TKA, Niederelbert)
Rotationsmikrotom „HM 315“	(Microm, Walldorf)
Schüttler „Vortex Genius 3“	(IKA, Staufen)
Sicherheitswerkbank „Biowizard 130 GL“	(Kojair, Vilppula, Finnland)
SpeedMill	(Biometra, Göttingen)
Standzentrifuge „Rotixa 50 RS“	(Hettich, Tuttlingen)
Sysmex pocH-100i	(Sysmex, Norderstedt)
Taumler „Modell 4010“	(Kottermann, Haningsen)
Thermometer	(Microlife, Schweiz)
Tiefkühltruhe -80°C „Forma ULT Freezer“	(Thermo Electron, Dreieich)
Tischzentrifuge „Universal 32 R“	(Hettich, Tuttlingen)
Tischzentrifuge „Z 233 MK-2“	(Hermle, Gosheim)
Toptical Thermocycler	(Biometra, Göttingen)
Transmigrationskammer, 10-Well µm	(NeuroProbe, Gaithersburg, USA)
Universalkammera "DP72"	(Olympus Deutschland GmbH, Hamburg)
Wärmeschrank	(Mettler GmbH & Co. KG, Schwabach)
Wasserbad	(Daglef Platz, Wankendorf)
Werkbank UVC IT-M-AR	(LFT Labortechnik GmbH, Wasserburg)
Zentrifuge für 96 Wellplatte Universal 320	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
Zentrifuge für Reaktionsgeäß 0,2ml	(Biozym, Hessisch Oldendorf)

Zentrifuge für Reaktionsgeäß 2ml Biofuge pico	(Heraeus, Roth, Karlsruhe)
--	----------------------------

### 3.2. Verbrauchsmaterialien

6 Well-Platten für Zellkultur	(Biochrom, Berlin)
96 Well-Platte für PCR	(4titude, Berlin)
96 Well-Platte für Zellkultur	(Greiner bio one, Frickenhausen)
Anaerocult®C 113682	(Merck,Darmstadt)
Anaerocult®C 116275	(Merck,Darmstadt)
Bacteriostatic Concentrate Solution	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
Biocoll	(Biochrom, Berlin)
Cleaning Solution Concentrate	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
Columbia Blood Agar Nr.279240	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Columbia CNA Blood Agar Nr.212104	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Decontamination Concentrate Solution	(Accuri Cytometers, Großbritannien)
DMEM, Ham-F12 Nr. 6421	(Sigma Aldrich, St. Louise)
DNA-/RNA-Exitus	(AppliChem, Darmstadt)
dNTP-Mix	(Promega, Madison, USA)
EDTA-Blutentnahmesystem „Monovette®“(9 ml)	(Sarstedt, Nümbrecht)
Einmal-Nitrilhandschuhe "Blue Nitril"	(neoLab Migge, Heidelberg)
Einmalspritzen „BD Discardit™“ II (10 ml, 20 ml)	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Einmalspritzen „BD Plastipak™“(Luer, steril, 50 mL)	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Einmal-Untersuchungshandschuhe, “Gentle skin® sensitive“	(Meditrade, Kiefersfelden)
Eppendorf-Reaktingefäße Rnase/Dnase frei 0,2ml	(Roth, Karlsruhe)

Eppendorf-Reaktingefäße Rnase/Dnase frei 1,5ml	(Biozym, Hessisch Oldendorf)
Ethanol 70 %	(Roth, Karlsruhe)
Experion Electrophorese Chip	(Biorad, Merck, USA)
Experion Electrophorese Prepartion Kid	(Biorad, Merck, USA)
FACS-Röhrchen	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
FACS-Röhrchen mit 35µm Siebdeckel	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Folie für 96 Well-Platte PCR	(4titude, Berlin)
Gibco Anti-Anti	(Life Technologies, Carlsbad USA)
innuSPEED Tissue RNA Kit	(Analytica Jena, Jena)
Kanülen „BD Microlance™ 3“ (steril, 1,2 x 40 mm)	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
LPS Nr. L6529	(Sigma Aldrich, St. Louise)
Manipler®	(B. Braun, Melsungen)
MM Sybergreen	(Bioline, Luckenwalde)
M-MLV RT 5x Reaction Buffer	(Promega, Madison, USA)
Natriumchlorid(NaCl)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
oligo dt Primer	(Promega, Madison, USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	(Biochrom, Berlin)
Dulbecco, ohneCa <sup>++</sup> /Mg <sup>++</sup>	
Pipetten, einstellbar (1-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL)	(Brand, Wertheim)
Pipetten, einstellbar (1-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1-5 ml)	(Biohit, Köln)
Pipetten, einstellbar „pipetman“ (1-10µL, 1-20µL, 10-100µL)	(Gilson, Villers Le Bel, Frankreich)
Pipettenspitzen "Biohit optifit Tip 5000 µL"	(Biohit, Köln)
Pipettenspitzen 1-10 µL weiß, 10-200 µL gelb und 100-1000 µL blau	(Brand, Wertheim)
Plastibrand 100µl	(Brand, Wertheim)
Progesteron Nr. P6149	(Sigma Aldrich, St. Louise)

---

Propidiumjodid (PI), minimum 95 % (HPLC)	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Rasierklingen	(Wilkinson, Solingen)
Recombinant Rnasin®	(Promega, Madison, USA)
RNAlater®	(Sigma-Aldrich, Steinheim)
Rnase/Dnase free Water	(life Technologies, Carlsbad USA)
Skalpellklingen Größe 21	(Roth, Karlsruhe)
Vacutainer Brand Luer Adapters	(Becton Dickinson S. A., Heidelberg)
Vacutainer® System, Halter	(Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
Vacutainerröhrchen, 10 ml, Heparin (170 IU)	(Becton Dickinson, Heidelberg)
Zahnstocher HygoStar EC 48.1	(Roth, Karlsruhe)





## **X. DANKSAGUNG**

Zunächst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Holm Zerbe für die Bearbeitung des Themas und das in mich gesetzte Vertrauen herzlich bedanken. Seine Unterstützung und konstruktiven Vorschläge haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Im besonderen Maße möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Walter Hermanns für die Betreuung des histologischen Teils bedanken. Durch seine Ausdauer und jahrelange Erfahrung hat er diesen Abschnitt erst ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. Straubinger und Herrn Dr. Wolf möchte ich für die Möglichkeiten der bakteriologischen Untersuchungen danken. Dank Ihrer Erfahrung ist es gelungen, diese auf einem hohen Niveau durch zu führen.

Für die Einführung in die Zytologie, und die Ratschläge auf diesem Gebiet möchte ich Herrn Prof. Ulrich Schenk danken

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Weber für die hervorragende Betreuung und den tiefgründigen wissenschaftlichen Austausch. Sein unermüdlicher Einsatz bei Problemen und deren Lösung haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Auch für die unbeschwerten Stunden im Labor, die ein konzentriertes Arbeiten ermöglichten und die nachhaltigen Ratschläge möchte ich mich herzlichst bedanken.

Frau Dr. Miriam Leipzig möchte ich für die tolle und ausdauernde Betreuung in der Pathologie danken. Mit aufmunternden Worten und ungebremstem Optimismus konnte sie auch die größeren Zweifel in Zuversicht umwandeln.

Frau Dr. Carola Sauter-Louis danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Für die Unterstützung bei der Datensammlung möchte ich sowohl Frau Dr. Sybille Rehmann vom Veterinäramt München, als auch der Firma Attenberger danken. In gleicher Weise möchte ich mich bei Herrn Dr. Harald Kyrie und der Firma Vion bedanken, die für ein reibungsloses Sammeln der Proben und für eine gute Arbeitsatmosphäre am Schlachthof sorgten. Nicht zuletzt gilt allen Metzgern in dieser Hinsicht ein herzliches Dankeschön.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre in den unterschiedlichen Laboren möchte ich mich bei den labortechnischen Assistentinnen der Pathologie, der Bakteriologie und der Klinik für Wiederkäuer bedanken. Insbesondere gilt mein

Dank Ingrid Hartmann, Christina Beyer und Frau Monika Altmann für die Hilfe im Kliniklabor. Frau Elisabeth Kemper, Sandra Kirsch und Heike Sperling möchte ich für die gründliche und vorbildhafte Einarbeitung in die Spezialgebiete der Immunhistochemie, der PCR und der Kunststofftechnik danken.

Abschließend möchte ich allen danken, die mir in dieser Zeit zur Seite standen und das Gelingen dieser Doktorarbeit auf ihre Weise unterstützt haben.